

FLÁVIO DE OLIVEIRA SILVA

**PERFIL DE PROTEASES E AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DE
LESÕES CUTÂNEAS EM CAMUNDONGOS TRATADAS COM A
LECTINA ISOLADA DAS SEMENTES DE *Canavalia brasiliensis***

Recife
2007

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

FLÁVIO DE OLIVEIRA SILVA

**PERFIL DE PROTEASES E AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DE
LESÕES CUTÂNEAS EM CAMUNDONGOS TRATADAS COM A
LECTINA ISOLADA DAS SEMENTES DE *Canavalia brasiliensis***

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como um dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciência Veterinária, na área de concentração Clínica.

Orientadora:
Prof^a Dr^a Ana Lúcia Figueiredo Porto

Co-Orientadora:
Prof^a Dr^a Ana Maria dos Anjos Carneiro-Leão

Recife
2007

FICHA CATALOGRÁFICA

S586p Silva, Flávio de Oliveira
Perfil de proteases e avaliação histopatológicas de lesões cutâneas em camundongos tratadas com a lectina isolada das sementes da *Canavalia brasiliensis* / Flávio de Oliveira Silva. -- 2008.
59 f. : il.

Orientadora : Ana Lúcia Figueiredo Porto
Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) - Universidade Federal Rural de Pernambuco. Departamento de Medicina Veterinária.
Inclui bibliografia.

CDD 636.089 6

1. Cicatrização
 2. *Canavalia brasiliensis*
 3. Metaloproteinases
 4. Lesão cutânea
 5. Biomateriais
- I. Porto, Ana Lúcia Figueiredo
II. Título

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

**PERFIL DE PROTEASES E AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DE LESÕES
CUTÂNEAS EM CAMUNDONGOS TRATADAS COM A LECTINA ISOLADA DAS
SEMENTES DE *Canavalia brasiliensis***

Dissertação de mestrado elaborada por:

FLÁVIO DE OLIVEIRA SILVA

Orientadora: Prof^ª Dr^ª ANA LÚCIA FIGUEIREDO PORTO

Aprovada em __/__/____

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª Dr^ª MARIA DAS GRAÇAS CARNEIRO DA CUNHA
Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco

Prof^º Dr^º GANDHI RADIS BAPTISTA
Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco

Prof^ª Dr^ª KEILA APARECIDA MOREIRA
Unidade Acadêmica de Garanhuns-Universidade Federal Rural de Pernambuco

À Giuliana Viegas Schirato, pela amizade e por compartilhar não só os bons, mas também os maus momentos de minha vida pessoal e científica.

À minha orientadora Prof^a Dr^a Ana Lúcia Figueiredo Porto, pela paciência, compreensão, apoio, motivação e oportunidade de desenvolver essa pesquisa.

Agradecimentos

A Deus, por colocar em minha vida pessoas que mim apóiam e ajudam. Toda honra e glória sejam concedidas a Ti Senhor.

Á minha mãe, Nice, e meus irmãos, Edílson Jr., Karla, Patrícia e Victória.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciência Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, na pessoa da Prof^a Dr^a Áurea Wischral.

A minha Co-orientadora Prof^a Dr^a Ana Maria dos Anjos Carneiro-Leão, pelo apoio e auxílio no processamento dos resultados.

A Rosângela Vidal, que esteve ao meu lado durante o desenvolvimento dessa pesquisa, obrigado pela ajuda, amizade e incentivo.

Ao Diretor do LIKA, Prof^o Dr^o José Luiz de Lima-Filho, pela contribuição para realização desse trabalho.

Ao Prof^o Dr^o Benildo de Sousa Cavada pela contribuição científica para o desenvolvimento desse projeto.

Ao Prof^o Dr^o Edson Holanda pela contribuição no desenvolvimento do artigo.

Aos amigos Cristina Bernardino, Iracema França, Patrícia Montalvão e Sandro Sales por tornarem a presença de Deus mais forte em minha vida.

Aos amigos Emmanuel, Eliana Queiroz, Nélia Paula, Shirley Karren, Silvânia Abdias, Suely Oliveira e Uziel Carneiro, pela amizade e apoio.

A Daniela Viana, Edgar Silveira, Maria Taciana e Veridiana Furtado, pela contribuição científica e amizade.

Aos amigos do Setor de Biotecnologia do LIKA, Carolina Lima, Camila Porto, Fernanda Vidal, Flaviane Monteiro, Gisele Dias, Germana Michele, Joana Firmino, Juciene Rodrigues, Júlio César, Maria Daniele, Maria da Conceição Gomes, Marília Sales e Rômulo Augusto.

Aos colegas do LIKA, em especial a Diego, Igor e Ricardo (Laboratório de Bioquímica), Conceição e Silvana (Laboratório de Imunologia) e Mariana Arruda, Nataly e Monique (Laboratório de Biologia Molecular).

A Maria Helena Madrugalha e Felipe Viegas pela colaboração no fornecimento dos animais utilizados nesse estudo.

A Carmelita Bezerra pela colaboração no processamento das lâminas utilizadas nas análises histopatológicas.

A Rafael, pela contribuição no processamento das amostras.

A Ian Amaral pela contribuição no aprendizado e desenvolvimento da metodologia para realizar as eletroforeses.

A Profª Drª Elizabete Chaves, Adriana e Humberto Bertão, do Setor de Bioquímica do LIKA, pelo fornecimento do material utilizado na eletroforese.

Aos colegas de turma, em especial, Aerlem Cynara, Cecília Carvalho, Guadalupe Xavier e Torquato Neto.

A todos vocês meus sinceros agradecimentos.

**“Não tenho dúvidas de que o meu Deus
é o Deus do impossível”**

RESUMO

Lectinas são proteínas de origem não imune que se ligam a carboidratos, podendo aglutinar células e glicoconjugados. Algumas dessas lectinas, como as obtidas de leguminosas da tribo Diocleinae possuem atividade farmacológica, a exemplo da *Canavalia brasiliensis* (ConBr) a qual exhibe especificidade de ligação D-manose/D-glicose. O objetivo desse estudo foi determinar o perfil de proteases e avaliar clinicamente e histopatologicamente o efeito do tratamento tópico de feridas cutâneas com a ConBr livre e conjugada com o seu açúcar específico. Para isso, lesões cirúrgicas foram produzidas na região dorsal de camundongos, divididos em grupos, de acordo com o tratamento que se segue: NaCl (150mM), manose (0,1M), ConBr (10µg) e ConBr/manose (10µg em solução fisiológica com manose 0,1M). O perfil das proteínas realizado através de eletroforese SDS-PAGE demonstrou a presença de proteínas com peso molecular compreendidos na faixa de 30 a 67 kDa, sugerindo a presença de metaloproteinases nos homogenatos obtidos a partir das lesões cutâneas. No 2º dia de pós-operatório (P.O.), o grupo ConBr/Manose foi o que apresentou a maior atividade proteolítica, no 7º dia de P.O., a maior atividade foi observada nos grupos ConBr e NaCl, finalmente, no 12º dia de P.O. a maior atividade proteolítica foi observada no grupo ConBr/manose. Na avaliação clínica observou-se que o grupo ConBr apresentou sinais inflamatórios menos intensos que os outros grupos avaliados, tendo evoluído com maior percentual de contração durante a fase de fibroplasia. Nas análises histopatológicas visualizou-se no 2º dia de P.O., a presença de crosta, infiltrado polimorfonuclear e neoangiogênese em todos os grupos estudados. No 7º dia de P.O., os grupos Manose, ConBr/Manose e ConBr apresentaram tecido de granulação com padrão fibrovascular enquanto no grupo NaCl foi visualizado tecido de granulação com padrão vascular. No 12º dia todos os grupos apresentaram reepitelização, porém o grupo ConBr/Manose apresentou melhor padrão de organização das fibras colágenas. A lectina isolada das sementes da *Canavalia brasiliensis* favoreceu o processo cicatricial das lesões cutâneas experimentais, tendo apresentado um melhor efeito sob o ponto de vista histopatológico quando usada em associação com a manose.

Palavras-chave: Biomateriais, cicatrização, *Canavalia brasiliensis*, metaloproteinases, lesão cutânea.

ABSTRACT

Lectins, carbohydrate binding proteins of non immune origin, agglutinate cells and glycoconjugates. Some proteins as the lectins from the Diocleinae tribe have described as pharmacological active molecules. Lectins form an important class of carbohydrate-binding proteins. *Canavalia brasiliensis* (ConBr) is a sugar-binding specificity [D-mannose (D-glucose)] protein. The aim of this study was evaluate the proteins profile and to evaluate histopathologically treated wounds with ConBr seeds lectins. Surgical wounds were produced in the dorsal region in albino Swiss mice. Each wound was daily treated topically along 11 days, as follow: ConBr (10µg), ConBr/Manose (10µg in manose 0,1M), manose (0,1M) and NaCl (150mM). Protein profile has done through SDS-PAGE and showed proteins with molecular weight between 30 and 70KDa, suggesting the presence of metalloproteinases in the homogenates gotten from the cutaneous injuries. In 2nd day of postoperative (PO), the ConBr/Manose group was what it presented the highest proteolytic activity, in 7th day of P.O., the highest activity was observed in the ConBr and NaCl groups. Finally, in 12th day of PO ConBr/manose group showed a maxim proteolytic activity. ConBr group showed flogistic signs less intense than others groups, had presented contraction percentile superior during the fibroplasia phase. In the first 48 hours it was observed, in all the studied groups, the presence of polymorphonuclear leukocyte infiltrate, crust and angiogenesis. At 7th day there was presence of fibrovascular (manose, ConBr Manose and ConBr) and vascular granulation tissue (NaCl) in studied groups. Finally, at 12th day, wounds showed reepithelization. In ConBr/manose group there was presence of fibrovascular granulation tissue with more organized collagen network. Results suggests that wound healing it was better in ConBr group, having presented one better effect when used in association with manose.

Keywords: Biomaterials, *Canavalia brasiliensis*, healing, metalloproteinases, skin wound.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Área das lesões (cm^2) dos grupos experimentais analisados durante a evolução do processo cicatricial.

Figura 2: Aspecto macroscópico das lesões cirúrgicas experimentais durante a evolução do processo cicatricial. Segundo dia pós-operatório (P.O.): A, grupo NaCl; B, grupo manose; C, grupo ConBr/manose; D, grupo ConBr; Sétimo dia P.O.: E, grupo NaCl; F, grupo manose; G, grupo ConBr/manose; H, grupo ConBr. Décimo segundo dia P.O.: I, grupo NaCl; J, grupo manose; K, grupo ConBr/manose; L, grupo ConBr.

Figura 3: Eletroforese dos grupos experimentais utilizados. A, C e E, grupo ConBr 2º, 7º e 12º dias P.O., respectivamente. B, F, G, grupo ConBr/Manose 2º, 7º e 12º dias de P.O., respectivamente.

Figura 4: Degradação do azocolágeno no 2º, 7º e 12º dias P.O.; Grupos ConBr e ConBr/Manose.

Figura 5: Aspectos histopatológicos das lesões dos grupos experimentais no 2º dia de pós-operatório (P.O). 1-grupo NaCl (NaCl 150mM), 2-grupo manose (manose 0,1M), 3-grupo ConBr (lectina ConBr 10 μg em solução fisiológica), 4-grupo ConBr/manose (lectina ConBr 10 μg em solução fisiológica contendo manose 0,1M). C-crosta, n-neovascularização.

Figura 6: Aspectos histopatológicos das lesões dos grupos experimentais no 7º dia de pós-operatório (P.O). 1-grupo NaCl (NaCl 150mM), 2-grupo manose (manose 0,1M), 3-grupo ConBr (lectina ConBr 10 μg em solução fisiológica), 4-grupo ConBr/manose (lectina ConBr 10 μg em solução fisiológica contendo manose 0,1M). C-crosta, T-tecido de granulação neoformado.

Figura 7: Aspectos histopatológicos das lesões dos grupos experimentais no 7º dia de pós-operatório (P.O). 1-grupo NaCl (NaCl 150mM), 2-grupo manose (manose 0,1M), 3-grupo ConBr (lectina ConBr 10 μg em solução fisiológica), 4-grupo ConBr/manose (lectina ConBr 10 μg em solução fisiológica contendo manose 0,1M). E-epitélio, F-tecido de granulação fibrovascular, C-crosta.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Fatores de crescimento envolvidos no processo cicatricial.

Tabela 2: Principais metaloproteinases secretadas durante a cicatrização cutânea.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 OBJETIVOS.....	15
2.1 Objetivo Geral	15
2.2 Objetivos Específicos	15
3 JUSTIFICATIVAS.....	16
4 REVISÃO DE LITERATURA	17
4.1 Cicatrização em Lesões Cutâneas.....	17
4.1.1 Fase Inflamatória	18
4.1.2 Fase de Fibroplasia	20
4.1.3 Fase de Remodelação	22
4.2 Metaloproteinases (MMP).....	23
4.3 Biomateriais.....	25
4.4 Lectinas.....	26
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30
6 ARTIGO CIENTÍFICO.....	40

1 INTRODUÇÃO

A principal função da pele é servir como uma barreira protetora entre o organismo animal e o meio ambiente. A perda de integridade de grandes porções da pele, como resultado de lesões, pode levar desde a perda da função até a morte (SINGER e CLARK, 1999).

A cicatrização é um processo complexo caracterizado por reepitelização, formação do tecido de granulação e remodelação da matriz extracelular (MEC) (WERNER e GROSE, 2003). A migração de células e a remodelação dos tecidos durante a cicatrização de feridas requerem o controle da degradação MEC e a ativação e liberação de fatores de crescimento (VASSALLI e SAURAT, 1996). Esses processos são realizados por proteases extracelulares, particularmente as pertencentes às famílias das serino e metaloproteinases (CARMELIET e COLLEN, 1995).

As metaloproteinases da matriz extracelular são uma família de endopeptidases e apresentam um importante papel na remodelação proteolítica da MEC, em várias situações fisiológicas, incluindo o reparo tecidual (KAHARI e SAARIALHO-KERE, 1997).

Recentes avanços em biologia celular e molecular têm expandido a compreensão dos processos biológicos envolvidos no reparo e regeneração tecidual e têm conduzido a um melhor cuidado no tratamento de feridas (SINGER e CLARK, 1999). Assim, apesar dos recentes avanços em tecnologia farmacêutica, a química sintética e a biotecnologia promoverem o desenvolvimento de fármacos novos e potentes, os produtos naturais como plantas e minerais continuam sendo a maior fonte para a obtenção de medicamentos para os mais diversos fins (NOORMOHAMED et al., 1994).

As lectinas constituem um grupo de proteínas de origem não-imune que compartilham a propriedade de se ligar de forma específica e reversível a carboidratos livres ou que façam parte de estruturas mais complexas, como membranas celulares. Elas contêm pelo menos dois sítios de ligação que podem se ligar em primeiro lugar a um glicídeo específico e secundariamente a uma molécula glicosilada (DIAZ et al., 1999).

Essas proteínas são largamente distribuídas na natureza, podendo ser encontradas em animais, plantas e microrganismos. Em animais e microrganismos, elas podem servir para mediar o reconhecimento biológico de diversos eventos relacionados à comunicação celular, desenvolvimento, defesa, metástase tumoral e inflamação (CAVADA et al., 2001).

Entre as lectinas mais estudadas estão as originárias de plantas, principalmente as da família Leguminosae, representando um grupo de proteínas similares estruturalmente, porém com diferentes especificidades a carboidratos. A subtribo Diocleinae (família Leguminosae) compreende 13 principais gêneros, sendo que algumas lectinas têm sido isoladas de plantas que pertencem a alguns destes gêneros: *Canavalia*, *Cratylia* e *Dioclea* (CAVADA et al., 2001).

A *Canavalia brasiliensis* (ConBr) é uma lectina com especificidade para D-glicose/D-manose (MOREIRA e CAVADA, 1984), isolada de sementes de plantas da família Leguminosae, tribo Phaseolae, subtribo Diocleinae. Entre os efeitos biológicos descritos para essa lectina estão a capacidade de estimular a proliferação de linfócitos e produção de interferon γ (BARRA-NETTO et al., 1992), induzir a produção de histamina em ratos (GOMES et al., 1994) e de óxido nítrico (ANDRADE et al., 1999), além do efeito protetor *in vivo* contra infecção pela *Leishmania amazonensis* em camundongos BALB/c (BARRA-NETTO et al., 1996), estimulação da produção de macrófagos em camundongos C3H/HeJ (RODRIGUEZ et al., 1992), além de ativar *in vivo* linfócitos T e induzir apoptose celular (BARBOSA et al., 2001)

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Determinar o perfil de proteases e avaliar histopatologicamente o efeito do tratamento tópico de feridas cutâneas com a lectina isolada das sementes da *Canavalia brasiliensis*.

2.2 Objetivos Específicos

Avaliar o processo cicatricial sob o ponto de vista clínico e com relação à contração das lesões experimentais;

Analisar o processo de cicatrização em relação ao aspecto histopatológico;

Determinar o perfil eletroforético e a atividade das proteases envolvidas no processo de cicatrização de lesões cutâneas.

3 JUSTIFICATIVAS

Feridas cutâneas são comuns na rotina da clínica veterinária. A busca por agentes que promovam o processo cicatricial é fundamental para que os pacientes possam ter um menor tempo de recuperação com o mínimo de desconforto possível. A utilização de plantas como base de novos agentes terapêuticos se faz importante pela grande biodiversidade existente em nossa flora e pela necessidade em se descobrirem novos fármacos, ao mesmo tempo em que se buscam reduzir os custos com a obtenção de novas substâncias. As lectinas constituem um grupo de proteínas/glicoproteínas que têm demonstrado variedades de efeitos *in vivo* e *in vitro*, atraindo o interesse de novas pesquisas para caracterização de seus efeitos biológicos.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 Cicatrização em Lesões Cutâneas

A pele é o maior e um dos mais complexos órgãos do organismo, constituindo-se numa adequada superfície de contato com o meio ambiente. Representando a principal barreira protetora do corpo, desempenha as seguintes funções: defesa contra agentes externos e nocivos, estando exposta aos mais diversos traumatismos. Protege o organismo contra a desidratação, armazenamento de lipídeos, carboidratos e proteínas, termo-regulação corporal, formação da vitamina D e função sensorial (DE NARDI et al., 2004).

A cicatrização é um processo complexo caracterizado por reepitelização, formação do tecido de granulação e remodelação da matriz extracelular (WERNER e GROSE, 2003) que apresenta três fases: Inflamatória, de Fibroplasia e de Remodelação (STADELMANN et al., 1998), com elementos celulares e extracelulares, citocinas e fatores de crescimento (Tabela 1), que atuam como sinalizadores supressores e promotores do processo cicatricial (KARUKONDA et al., 2000).

Dois processos estão envolvidos na cicatrização da maioria das feridas: reparo e regeneração. A regeneração é a substituição do tecido lesado por um tecido semelhante àquele perdido na lesão. Nos mamíferos, a regeneração só ocorre em tecidos com grande potencial mitótico, como o epitélio, o fígado e os ossos. Já o reparo é o processo pelo qual os defeitos teciduais são substituídos por uma cicatriz não funcional. Esse processo é caracterizado por uma cascata de eventos celulares e humorais que se iniciam com a coagulação e compreendem a inflamação, a proliferação de fibroblastos e o remodelamento, visando o reparo tecidual e a reposição de colágeno (PEREIRA e ARIAS, 2002).

O processo de reparo ocorre com o objetivo de restaurar a integridade anatômica e funcional do tecido durante a resposta inflamatória, caracterizando-se por uma sucessão complexa de eventos bioquímicos e celulares em resposta à lesão tecidual. Para que um ferimento seja curado com êxito, os eventos devem suceder-se em uma seqüência apropriada, e o resultado final é geralmente uma cicatriz de tecido conjuntivo, representando o somatório dessas etapas (CARVALHO, 2002) que não são mutuamente excludentes, mas sobrepostas no tempo (LI et al, 2007).

Tabela 1. Fatores de crescimento envolvidos no processo cicatricial

Fator de crescimento	Fonte	Funções na cicatrização
PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas)	Plaquetas, macrófagos, células endoteliais e células lesadas	Quimiotaxia, proliferação de fibroblastos e produção de colágeno
TGF- β (fator de crescimento transformante β)	Plaquetas, macrófagos, linfócitos, fibroblastos, células endoteliais e epiteliais e células lesadas	Quimiotaxia, proliferação de fibroblastos e metabolismo do colágeno
EGF (fator de crescimento epidermal)	Plasma, plaquetas, células epiteliais	Proliferação de células epiteliais e formação do tecido de granulação
TGF- α fator de crescimento transformante α	Macrófagos ativados, plaquetas, células epiteliais e células lesadas	Proliferação de células epiteliais e formação do tecido de granulação
KGF (fator de crescimento de queratinócitos)	Fibroblastos	Proliferação de células epiteliais
IL-1 (interleucina 1)	Macrófagos	Proliferação de fibroblastos
FGF (fator de crescimento para fibroblastos)	Hipófise, macrófagos, fibroblastos, células endoteliais	Proliferação de fibroblastos, deposição da matrix extracelular contração da lesão e angiogênese
TNF- α (fator de necrose tumoral α)	Macrófagos, linfócitos T	Proliferação de fibroblastos
IGF-1 (fator de crescimento semelhante à insulina)	Plasma, fígado e fibroblastos	Proliferação de fibroblastos, síntese de proteoglicanos sulfatados e colágeno
IFNs (interferons)	Linfócitos e fibroblastos	Inibição da proliferação de fibroblastos e síntese de colágeno
VEGF (Fator de crescimento endotelial)	Queratinócitos, macrófagos	Angiogênese

4.1.1 Fase Inflamatória

O processo inflamatório tem início na lesão ou na morte das células do tecido agredido. Todos os tipos de agressão induzem o mesmo tipo de resposta nos vasos sanguíneos

menores, mas ela varia de intensidade de um tecido para outro, tanto nas fases iniciais quanto no resultado final. Além do tipo de tecido, a extensão do traumatismo é fator importante, sendo que a resposta inflamatória será tanto mais intensa quanto à lesão tecidual (BEVILACQUA e MODOLIN, 1995).

A seqüência de eventos que ocorrem na cicatrização cutânea ocorre logo após a injúria, com a ativação da cascata da coagulação e início da fase inflamatória. A lesão causa o rompimento de vasos sanguíneos e saída de constituintes do sangue para o espaço da ferida. Ocorre a ativação plaquetária e formação do coágulo (TSIROGIANNI et al., 2006) que consiste de plaquetas envolvidas numa rede de fibras de fibrina e quantidades menores de fibronectina, vitronectina e trombospondina. Além de servir como um reservatório de citocinas e fatores de crescimento liberados das plaquetas ativadas (MARTIN, 1997), o coágulo serve também para coaptar as bordas da ferida e cruzar a rede de fibronectina, oferecendo uma matriz provisória, na qual os fibroblastos, as células endoteliais e os queratinócitos possam ingressar na área lesada (MANDELBAUM et al., 2003).

Os fatores de crescimento iniciam a inflamação, epitelização, angiogênese e contração da ferida. O fator de crescimento derivado de plaquetas e o fator de crescimento epidermal liberados das plaquetas atraem neutrófilos e monócitos/macrófagos para a ferida (SONEJA et al., 2005).

Os neutrófilos são as primeiras células sanguíneas a chegar ao local da lesão, sendo importantes para proteção da ferida contra infecção pela fagocitose de microrganismos e de restos teciduais desvitalizados. Neutrófilos ativados liberam radicais de oxigênio livres e enzimas lisossomais, incluindo proteases neutras, collagenases e elastases que combatem a infecção e limpam a área lesionada (STADELMAN et al., 1998).

Inicialmente, os macrófagos atuam de maneira semelhante aos neutrófilos, fagocitando e matando microrganismos através da secreção de metabólitos do oxigênio e de enzimas lisossomais. No entanto, os macrófagos também regulam a produção de collagenase pelos fibroblastos através da secreção de interleucina-1, sendo ainda fonte de fatores angiogênicos e fatores de crescimento para os fibroblastos, estimulando-os a secretar colágeno (TIZARD, 1998). O debridamento tecidual via fagocitose é facilitado pela produção de collagenase e elastase (WITTE e BARBUL, 1997).

A maior contribuição dos macrófagos para a cicatrização de feridas é a secreção de citocinas e fatores de crescimento. Estas citocinas ativam e recrutam macrófagos e linfócitos, regulando também, a migração e proliferação de fibroblastos e a síntese de colágeno, assim

como células endoteliais. Por meio dessas funções, os macrófagos influenciam a angiogênese, fibroplasia e formação da matriz extracelular (PARK e BABUL, 2004).

A MEC é composta por diferentes proteínas com múltiplas funções. Algumas proteínas como elastina e alguns tipos de colágeno, são produzidas como fibras insolúveis, e conferem resistência e elasticidade aos tecidos. Várias glicoproteínas diferentes da matriz como lamininas, fibronectina, trombospodinas, fibrilinas, entre outras, formam agregados com vários graus de complexidade, fornecendo um substrato para adesão celular e são importantes para inúmeras interações proteína-proteína. Os proteoglicanos nos quais a massa de carboidratos excede a de proteínas têm função na hidratação tecidual. Todas as proteínas da matriz podem ser degradadas pelas metaloproteinases (MMP) (PARKS, 1999).

4.1.2 Fase de Fibroplasia

- **Reepitelização**

A reepitelização é o restabelecimento da camada epitelial na área ferida com novo epitélio e consiste da migração e proliferação de queratinócitos a partir das margens da lesão (SANTORO e GAUDINO, 2005). Após o rompimento do epitélio pela injúria tecidual, a reepitelização deve ocorrer o mais rápido possível a fim de restabelecer a integridade tecidual. Os queratinócitos movimentam-se para a ferida cerca de 24h depois da lesão. Células epiteliais de estruturas epiteliais residuais perdem suas conexões hemidesmosomais desprendendo-se da membrana basal e movendo-se rapidamente através do leito lesionado (HAKKINEN et al, 2000).

- **Neoangiogênese**

Fatores locais no microambiente da ferida como baixo pH, tensão de oxigênio reduzida e aumento da concentração de lactato, levam a liberação de fatores de crescimento como o VEGF e bFGF que são necessários para a nova formação de vasos sanguíneos, processo denominado angiogênese ou neovascularização (DIEGELMANN e EVANS, 2004).

A neovasculatura das feridas, denominada de angiogênese, é o processo de brotamento de vasos a partir de vasos preexistentes e tem como função suprir de nutrientes o tecido de cicatrização. Na angiogênese, as células endoteliais crescem para fora, em direção à margem da ferida aparentemente em resposta a sinais quimiotáticos e mitogênicos das plaquetas e

macrófagos (HUNT e GOODSON, 1993). O estímulo responsável pela angiogênese é multifatorial e relacionado à liberação de diversos fatores solúveis (peptídeos) na ferida. Tais fatores de crescimento têm potentes propriedades biológicas de quimioatração e mitogênicas demonstradas através de sistemas experimentais *in vitro* e ensaios *in vivo* (FAZIK et al., 2000).

- **Formação do Tecido de Granulação**

A resolução da área lesada necessita não só da reepitelização, mas também, da proliferação e migração de fibroblastos no leito da ferida, onde participam da formação do tecido de granulação e sintetizam, depositam e reorganizam a nova matriz extracelular (IYER et al., 1999).

O tecido de granulação geralmente é formado a partir do quarto dia após a lesão sendo constituído principalmente por macrófagos, novos capilares, fibroblastos e tecido conjuntivo frouxo. O tecido de granulação é um complexo reservatório de citocinas com atividades quimioatrativas, mitogênicas e fatores de crescimento. As citocinas liberadas pelos macrófagos estimulam os fibroblastos a sintetizar a nova matriz extracelular (AUKHIL, 2000) formada principalmente por fibrina, fibronectina e ácido hialurônico que servem de suporte para o crescimento celular e vascular (SINGER e CLARK, 1999).

Os fibroblastos do tecido conjuntivo das margens da ferida tornam-se ativados, proliferam, migram em direção ao coágulo em reabsorção e começam a sintetizar os componentes da MEC, que é uma rede complexa de macromoléculas secretadas (colágenos, elastina, glicoproteína e proteoglicanas), localizadas no espaço extracelular, tendo um papel central no controle dos processos celulares. Todos esses componentes estão em íntimo contato com suas células de origem e formam um leito gelatinoso tridimensional no qual as células evoluem (BAYNES e DOMINICKZAC, 2000). Com a evolução do processo cicatricial a matriz provisória é substituída por uma nova matriz rica em colágeno (AUKHIL, 2000).

Os colágenos são as principais proteínas da MEC perfazendo aproximadamente 25% da massa protéica total do organismo. Sendo os componentes estruturais primários da MEC, eles têm papel fundamental na arquitetura tecidual, na resistência dos tecidos e em uma ampla variedade de interações célula-célula e célula-matriz (BAYNES e DOMINICKZAC, 2000). Os principais colágenos são os tipos I, II e III que formam uma rede de fibras no interstício dos

tecidos, ligando células entre si e a outros componentes estruturais e o tipo IV, que é o maior componente da membrana basal (MUTSAERS et al., 1997).

Com o desenvolvimento do tecido de granulação, os fibroblastos desenvolvem características de miofibroblastos, incluindo o aparecimento de microfilamentos citoplasmáticos contendo α -actina muscular lisa. O aparecimento desses miofibroblastos está relacionado com a contração e fechamento da lesão por meio de adesões focais entre os miofibroblastos e a MEC (MCANULTY, 2006).

4.1.3 Fase de Remodelação

O processo de remodelamento da cicatriz envolve etapas sucessivas de produção, digestão e orientação das fibrilas de colágeno. A deposição é feita a princípio de maneira aleatória tendo como orientação a organização da fibronectina e dependente da natureza e direção das tensões aplicadas ao tecido. Essas fibras são subsequentemente digeridas pela collagenase, resintetizadas, rearranjadas de acordo com a organização das fibras do tecido conjuntivo adjacente e lateralmente ligadas por ligações covalentes. Essas ligações são formadas entre moléculas de tropocolágeno no âmbito da fibrila e entre as próprias fibrilas. Repetições sucessivas da lise, ressíntese, redirecionamento e religação formam fibras maiores de colágeno e resultam numa configuração mais regular da cicatriz. Isso aumenta a sua resistência devido à organização das fibras acompanhar as forças mecânicas a que o tecido está sujeito durante a atividade normal (CLARK, 1985).

A relação inversa entre o aumento da tensão na ferida e a diminuição do tamanho é devida principalmente à remodelação da MEC. Este processo representa o balanço entre a produção, quebra e remodelamento do colágeno. A produção de colágeno aumenta até o 21º dia após o trauma, e após esse tempo, a taxa de síntese diminui (MÔNACO e LAWRENCE, 2003).

A remodelação do colágeno durante a transição do tecido de granulação à cicatriz é dependente da síntese e catabolismo de colágeno em velocidade baixa. A degradação do colágeno na ferida é controlada por muitas enzimas proteolíticas designadas metaloproteinases, as quais são secretadas pelos macrófagos, células epidermais, assim como fibroblastos. Esse evento de remodelação do colágeno é responsável pelo aumento da força de tensão e da diminuição do tamanho da cicatriz. O resultado normal da fase de remodelação da cicatrização é uma cicatriz com aproximadamente 80% da força de tensão da pele íntegra (FAZIK et al., 2000).

À medida que a cicatriz torna-se madura, fica menos vermelha, devido à mudanças na densidade dos capilares dentro do leito da ferida com o passar do tempo. Feridas recentes são caracterizadas por um tecido de granulação contendo um nível relativamente elevado de capilares, enquanto as mais maduras possuem menos vasos (REED et al., 1993). O número de fibroblastos também diminui. Essas mudanças fazem com que a cicatriz seja relativamente acelular (COLOUMBE, 2003).

4.2 Metaloproteinases (MMP)

A degradação proteolítica da matriz extracelular é uma característica essencial do reparo e remodelação durante a cicatrização (GEARING et al., 1994).

As MMP responsáveis pela degradação da matriz extracelular são divididas em três classes: serino proteinases (incluindo, os ativadores de plasminogênio, leucócito elastase, e catepsina G), MMP (colagenases, gelatinases, estromalisinas, matrizlisinas, metaloelastases) e cisteíno proteinases (LORENA et al., 2002).

As MMP da matriz formam uma importante família de metaloendopeptidases que representam a maior classe de enzimas responsáveis pela degradação da matriz extracelular. Em conjunto, as MMP são capazes de degradar todas as proteínas da MEC. Todos os membros da família são secretados como pro-enzimas inativas (zimógenos) e são ativados no tecido pela clivagem do propeptídeo. Todas as MMP contém zinco em seu sítio ativo e necessitam de cálcio para estabilidade e atividade (BRIKEDAL-HANSEN, 1993).

As atividades das MMP estão relatadas em importantes enfermidades como destruição da articulação na artrite reumatóide, osteoartrite, aneurisma da aorta abdominal, infarto agudo do miocárdio e câncer. As MMP também participam no processo normal de remodelação como desenvolvimento embrionário, involução do útero pós-parto, remodelação óssea, ovulação e cicatrização (WOESSNER Jr, 1991).

De acordo com Barrick et al (1999), as MMP podem ser subdivididas em vários grupos baseados na especificidade do substrato (Tabela 2).

Tabela 2 Principais metaloproteinasas secretadas durante a cicatrização cutânea

Proteinase	Substratos
Colagenase intersticial (MMP-1)	Colágenos I, II, VII, X, gelatina, proteoglicanos
Colagenase intersticial (MMP-8)	Colágeno I, III, VII, X, gelatina, proteoglicanos, inativação de inibidores: α -2 macroglobulina
Gelatinase A (MMP-9)	Colágenos IV, V, VII, X, XI, gelatina, elastina, fibronectina, laminina, entacina, ativação do pro-IL-1 β
Gelatinase B (MMP-2)	Os mesmos que a MMP-9
Estromalisinas (MMP-3 e 10)	Colágeno IV, V, IX, XI, fibronectina, laminina, entacina, proteoglicanos, ativação de pro MMP (1, 8 e 9)
Matrizlisinas (MMP-7)	Colágeno IV, elastina, fibronectina, laminina, entacina, proteoglicanos
Metaloelastase (MMP-12)	Colágeno IV, elastina, fibronectina, laminina, entacina, proteoglicanos

Fonte: BARRICK et al., 1999

As MMP participam de vários eventos que ocorrem durante a cicatrização cutânea, como remoção do tecido desvitalizado, interações epidermais-mesenquimais durante a migração dos queratinócitos, angiogênese, remodelação da matriz extracelular neoformada e regulação da atividade de fatores de crescimento. Na pele, diferentes tipos de células como as inflamatórias, fibroblastos e células endoteliais são capazes de sintetizar as MMP. (KÄHÄRI e SAARIALHO-KERE, 1997).

Os leucócitos expressam várias proteinases que são fundamentais nos processos que ocorrem durante o processo cicatricial, estando envolvidas na modulação da inflamação e da resposta imune e na ativação de alguns fatores de crescimento (BARRICK et al., 1999).

A expressão de muitas MMP, incluindo MMP-2, é estimulada por muitos fatores de crescimento que promovem a migração endotelial durante a angiogênese. Estes fatores incluem VEGF, TNF- α e FGF-2. A função das MMP durante a neovascularização incluem a degradação de componentes da membrana basal e a dissecação da matriz extracelular. Enquanto as células endoteliais migram, formam túbulos e eventualmente novos capilares. As principais MMP envolvidas na neoformação de vasos são MMP-1, MMP-2, MMP-9, MT-MMP e MMP-19. A presença da MMP-1 é necessária para que ocorra a migração das células

endoteliais dentro da matriz de colágeno tipo I. MMP-2 e MMP-9 influenciam a formação de túbulos e migração das células endoteliais. O papel exato da MT-MMP não está elucidado, mas sabe-se que sua ausência prejudica a diferenciação dos novos vasos. A MMP-19 já foi detectada em células endoteliais do tecido sinovial lesado e inflamando sugerindo uma possível ação na angiogênese (BAUM e ARPEY, 2005).

A remodelação do colágeno durante a transição do tecido de granulação para cicatriz é dependente da sua contínua síntese e catabolismo. A degradação do colágeno na ferida é controlada pelas metaloproteinases, as quais são secretadas por macrófagos, células epidérmicas, endoteliais e fibroblastos (SINGER e CLARK, 1999).

As MMP são especificamente inibidas pelos inibidores teciduais (TIMP), que são sintetizados por células do tecido conectivo e leucócitos, e formam complexos não covalentes com as MMP (MURPHY e DOCHERTY, 1992).

Durante as fases iniciais da cicatrização, o balanço entre MMP e seus inibidores endógenos (TIMP), favorece a produção da MEC. Nas fases finais do processo cicatricial, quando tem início a remodelação, é possível que o balanço mude e favoreça a degradação da matriz (GRINNEL, 2003).

4.3 Biomateriais

Na medicina veterinária existe uma grande casuística de cães apresentando lesões traumáticas ou secundárias a outros fatores que levam ao aparecimento de feridas e ulcerações cutâneas, que são tratadas por segunda intenção com agentes cicatrizantes (NOGUEIRA et al., 2005).

Para otimizar a reabilitação de lesões, pode-se utilizar biomateriais, compreendidos como materiais interativos capazes de estabelecer uma afinidade apropriada com o tecido vizinho sem indução de uma resposta adversa do hospedeiro (RATNER e BRYANT, 2004).

Biomaterial é definido como qualquer substância ou combinação de substâncias, de origem natural ou sintética, que possam ser usadas por qualquer que seja o período de tempo, como parte ou como o todo de sistemas que tratam, aumentam ou substituem quaisquer tecidos, órgãos ou funções do organismo (ASM, 1992).

Os biomateriais têm sido objeto de pesquisas científicas pela disponibilidade na natureza e por sua biodegradabilidade, e muitos podem ser utilizados como dispositivos dérmicos (SPECTOR, 2001), e têm sido empregados para conduzir e acelerar fenômenos de ocorrência natural como a regeneração de tecidos na cicatrização das feridas, indução da

resposta celular que não deve normalmente estar presente, a cicatrização em indivíduos doentes, a produção de um novo leito para receber futuros transplantes ou para bloquear fenômenos naturais como a rejeição imune de transplante da célula de outras espécies ou a transmissão de sinais de fatores de crescimento que estimulam a formação da cicatriz (HUBBEL, 1995).

O uso das espécies vegetais, com fins de tratamento e cura de doenças e sintomas, remonta ao início da civilização, quando o homem começou um longo percurso de manuseio, adaptação e modificação dos recursos naturais para seu próprio benefício (DI STASI, 1996).

O emprego de produtos medicinais de origem natural no tratamento de certas doenças tem sido amplamente utilizado pela população, mas poucas pesquisas têm sido realizadas a fim de atribuir a estes os seus efeitos terapêuticos. Alguns estudiosos mencionaram que elementos existentes na natureza poderiam constituir materiais alternativos para o tratamento local das feridas, já que os curativos disponíveis, sintéticos ou biossintéticos, utilizados tanto no homem como em outras espécies são onerosos (SILVA et al., 2000).

As plantas são importantes fontes de produtos naturais biologicamente ativos, os quais diferem em termos de estrutura e propriedades biológicas (MOREIRA et al., 2001).

Muitas plantas são conhecidas pelo seu uso na cicatrização de feridas em um sistema de medicina tradicional, ainda que seu mecanismo de ação e eficácia sejam muito pouco avaliados em experimentos clínicos controlados (NAGAPPA e CHERIYAN, 2001).

4.4 Lectinas

- **Aspectos Gerais**

Proteínas que interagem com carboidratos não-covalentemente ocorrem amplamente na natureza, por exemplo, enzimas carboidrato-específicas e anticorpos anticarboidratos. Em estudos realizados nos últimos anos, uma outra classe de proteínas, as lectinas, está tendo destaque em pesquisas biológicas. Essas se caracterizam por ligarem-se a mono e oligossacarídeos de maneira reversível e com alta especificidade, mas são desprovidas de atividade catalítica. Em contraste com os anticorpos, não são produtos da resposta imune. Cada lectina contém dois ou mais sítios de ligação para carboidratos, são di-ou polivalentes. Conseqüentemente, quando reagem com células, por exemplo, eritrócitos, não só se combinam com os glicídeos de sua superfície, mais também, formam ligações cruzadas entre

as células, causando precipitação, um fenômeno denominado, aglutinação celular (LIS e SHARON, 1998).

As funções fisiológicas das lectinas de plantas não estão claramente definidas. Sugere-se que possuem diferentes papéis nas plantas, incluindo transporte de carboidratos, estocagem e mobilização de proteínas de reserva e carboidratos, alongamento da parede celular, interação entre plantas e microrganismos e defesa contra o ataque de fungos, bactérias e insetos (RATANAPO et al., 2001). A maior quantidade de lectinas de plantas é encontrada nos órgãos de estoque, nas outras partes, as quantidades são bem menores, não sendo necessariamente idênticas em relação à estrutura ou especificidade de carboidratos como as lectinas dos órgãos de estoque.

Dependendo da planta, os órgãos de estoque apresentam diferentes localizações como, por exemplo, nas leguminosas, estes órgãos encontram-se nas sementes e, na batata, encontram-se no tubérculo (RÜDIGER, 1998). As lectinas constituem de 2 a 10% do total de proteínas das sementes (DIAZ et al., 1999).

Apesar de sua abundância em muitas plantas, as lectinas de plantas não possuem sua verdadeira função fisiológica claramente definida. Entre algumas funções propostas para lectinas de plantas estão incluídas: armazenamento ou transporte de carboidratos em sementes, inibição do crescimento de fungos (SHARON e LIS, 1989) ou atividade inseticida (TRIGUEROS et al., 2003).

- **Deteção, Especificidade e Classificação**

A hemaglutinação é o ensaio mais comum para verificar a presença de lectinas e estimar sua atividade. Nesse ensaio, a solução contendo a lectina é diluída em série e incubada com eritrócitos humanos ou de outros animais. Para aumentar a sensibilidade das células à aglutinação, as mesmas podem ser submetidas a um tratamento químico (glutaraldeído ou formaldeído) ou enzimático (tripsina, papaína ou neuraminidase). Paralelamente, outros métodos podem ser utilizados para identificar a atividade de lectinas como análise fotométrica, precipitação de polissacarídeos ou glicoproteínas e eletroforese de afinidade (KENNEDY et al., 1995).

A determinação da especificidade de uma lectina é dada pelo monossacarídeo que em menor concentração, possui habilidade para inibir sua atividade de hemaglutinação ou precipitação de polissacarídeos ou glicoproteínas (NG e YU, 2001). Existem lectinas que possuem especificidade para mais de um carboidrato, aglutinando células de diferentes

espécies. Também existem lectinas que só aglutinam as células em que houver a presença de um determinado carboidrato (GABOR et al., 2001).

As lectinas de plantas podem ser classificadas de acordo com sua especificidade de interação com carboidratos, em lectinas glicose/manose (CORREIA e COELHO, 1995), galactose específicas (CAVADA et al, 1998), ácido-siálico específicas e manose específicas (KOIKE et al., 1995).

- **Interação das Lectinas com o Sistema Imune**

Lectinas de plantas têm sido utilizadas em pesquisas imunobiológicas, sendo capazes de estimular células do sistema imune, como neutrófilos, macrófagos e linfócitos. Em 1960, Peter C. Nowel, da Universidade da Pensilvânia, Filadélfia, demonstrou que a lectina *Phaseolus vulgaris*, conhecida como fitohemaglutinina (PHA), era mitogênica, ou seja, possuía capacidade de estimular a proliferação de linfócitos (SHARON e LIS, 2004). Desde então, outras pesquisas realizadas também demonstraram o efeito das lectinas sobre o sistema imunológico. As lectinas de *Aloe arborescens* (KOIKE et al., 1995), *Phytolacca lúlea* (VAN DAMME et al., 1995), *Canavalia brasiliensis*, *Dioclea grandiflora*, *Dioclea violacea* (BARBOSA et al., 2001), *Belamya begalensis* (BANERJEE et al., 2004) e *Cratylia mollis* (MACIEL et al., 2004), são alguns exemplos de lectinas que apresentam atividade mitogênica.

Rodriguez et al (1992), demonstraram que as lectinas de *Canavalia brasiliensis* e *Dioclea grandiflora*, estimulam o influxo de monócitos para a cavidade peritoneal em camundongos C3H/CeJ. Lectinas vegetais também possuem atividade antiinflamatória quando administradas por via intravenosa em ratos Wistar (ASSREUY et al., 1997) e são capazes de induzir a migração de neutrófilos e monócitos quando injetadas por via intraperitoneal (ALENCAR et al., 2003; FREIRE et al., 2003 ALENCAR et al., 2005).

Lopes et al (2005) verificaram a liberação de histamina por mastócitos peritoneais de ratos Wistar induzida por lectinas de *Canavalia brasiliensis*, *Cymbosema roseum*, *Maackia amurensis*, *Parkia platycephala* e *Triticum vulgare*.

Lectinas estimulam a síntese de citocinas. A lectina de *Viscum album* induz a produção do Fator de Necrose Tumoral- α em monócitos humanos e macrófagos de camundongos C3H/CeJ (MANNEL et al., 1991). Diversas lectinas da família Diocleinae estimulam a produção de interleucina-4, -10, do Fator de Necrose Tumoral- α e do Fator Estimulante da Colônia de Macrófagos (CAVADA et al., 2001).

De acordo com Andrade et al (1999), lectinas de *Canavalia brasiliensis*, *Dioclea grandiflora*, *Pisum avense* e *Concanavalina A*, induzem a produção de óxido Nítrico (ON) *in vivo* e *in vitro*, sendo o ON um agente que pode estar envolvido nos efeitos anti-parasitários e anti-tumorais das lectinas.

- **A Família Diocleinae**

Entre as lectinas mais estudadas estão as extraídas de plantas, principalmente as da família Leguminosae. Lectinas dessa família representam um grupo de proteínas similares estruturalmente, porém com diferentes especificidades a carboidratos. A subtribo Diocleinae (família Leguminosae) compreende 13 principais gêneros, sendo que algumas lectinas têm sido isoladas de plantas que pertencem a alguns destes gêneros: *Canavalia*, *Cratylia* e *Dioclea*. Todas as lectinas Diocleinae apresentam estruturas multiméricas compostas de monômeros de 25,5 KDa, além de exibirem a característica de equilíbrio dímero-tetrâmero dependente de pH (CALVETE et al, 1999). São metaloproteínas que requerem íons divalentes (Ca^{2+} e Mn^{2+}) para exibir atividade biológica completa (SANZ-APARICIO et al., 1997). Cada subunidade também contém sítios de ligação para íons Ca^{2+} e Mn^{2+} e uma cavidade hidrofóbica que interage com ligantes hidrofóbicos, como fito-hormônios. Todas essas lectinas apresentam como especificidade principal de reconhecimento os carboidratos D-manose e D-glicose (CAVADA et al., 2001).

Apesar da proximidade filogenética e estruturas altamente conservadas das lectinas da família Diocleinae, elas possuem atividades biológicas diferentes como estimulação de macrófagos peritoneais em camundongos C3H/HeJ (RODRIGUEZ et al., 1992), proliferação de linfócitos e produção de interferon- γ *in vitro* (BARRAL-NETTO et al., 1992), indução de edema de pata em ratos (BENTO et al., 1993), proliferação de linfócitos e produção de interferon- γ *in vivo* (BARBOSA et al., 2001) e liberação de histamina de mastócitos peritoneais em ratos (GOMES et al., 1994; LOPES et al., 2005).

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALENCAR, N.M.; ASSREUY, A.M.; ALENCAR, V.B.; MELO, S.C.; RAMOS, M.V.; CAVADA, B.S.; CUNHA, F.Q.; RIBEIRO, R.A. The galactose-binding lectin from *Vatairea macrocarpa* seeds induces in vivo neutrophil migration by indirect mechanism. **The International Journal Of Biochemistry & Cell Biology**, v.35, n.12, p.1674-1681, 2003.

ALENCAR, V.B.M., ALENCAR, N.M.N., ASSREUY, A.M.S., MOTAB, M.L., BRITO, G.A.C., ARAGÃO, K.S., BITTENCOURT, F.S., PINTO, V.P.T., DEBRAY, H., RIBEIRO, R.A., CAVADA, B.S. Pro-inflammatory effect of *Arum maculatum* lectin and role of resident cells. **The International Journal of Biochemistry e Cell Biology**, v. 37, p. 1805–1814, 2005.

ANDRADE, J. L.; ARRUDA, S.; BARBOSA, T.; PAIM, L.; RAMOS, M. V.; CAVADA, B. S.; BARRAL-NETTO, M. Lectin induced nitric oxide production, **Cellular Immunology**, v. 194, n. 1, p. 98-102, 1999.

ASM HANDBOOK. Materials characterization, 9. ed. p. 297-426, 1992.

ASSREUY, A. M. S.; SHIBUYA, M. D.; MARTINS, G. J.; DE SOUZA, M. L. P.; CAVADA, B. S.; MOREIRA, R. A.; OLIVEIRA, J. T. A.; RIBEIRO, R. A.; FLORES, C. A. Anti-inflammatory effect of glucose-mannose binding lectins isolated from Brazilian beans. **Mediators of Inflammation**, v. 6, n.3, p.201-210, 1997.

AUKHIL, I. Biology of wound healing. **Periodontology**, v. 22, p, 44-50, 2000.

BANERJEE, S.; CHAKI, S.; BHOWAL, J.; CHATTERJEE, B.P. Mucin binding mitogenic lectin from freshwater Indian gastropod *Belamyia bengalensis*: purification and molecular characterization. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.421, n.1, p.125-134, 2004.

BARBOSA, T.; ARRUDA, S.; CAVADA, B.; GRANGEIRO, T. B.; FREITAS, L. A. R.; BARRAL-NETTO, M. In vivo lymphocyte activation and apoptosis by lectins of Diocleinae subtribe. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.5, p.673-678, 2001.

BARRAL-NETTO, M.; SANTOS, S. B.; BARRAL, A.; MOREIRA, L. I. M.; SANTOS, C. F.; MOREIRA, R. A.; OLIVEIRA, J. T.; CAVADA, B. S. Human lymphocyte stimulation by legume lectins from the Diocleae tribe. **Immunological Investigations**, v. 21, p. 297-303, 1992.

BARRAL-NETTO, M.; VON SOHSTEN, R. L.; TEIXEIRA, M.; SANTOS, W. L.; POMPEU, M. L.; MOREIRA, R. A.; OLIVEIRA, J. T.; CAVADA, B. S.; FALCOFF, E.; BARRAL, A. In vivo protective effect of the lectin from *Canavalia brasiliensis* on Balb/c mice infected by *Leishmania amazonensis*. **Acta Tropica**, v. 60, n. 4, p. 237-250, 1996.

BARRICK, B.; CAMPBELL, E.J.; OWEN, C.A. Leukocyte proteinases in wound healing: roles in physiologic and pathologic processes. **Wound Repair and Regeneration**, v.7, n.6, p. 410-422, 1999.

BAUM, C.L; ARPEY, C.J. Normal cutaneous wound healing: clinical correlation with cellular and molecular events. **Dermatology Surgery**, v. 31, p. 674-686, 2005.

BAYNES, J.; DOMINICKZAC, M. Bioquímica médica, São Paulo: Artes Médicas, 2000.

BENTO, C.A.M.; CAVADA, B.S.; OLIVEIRA, J.T.A.; MOREIRA, R.A.; BARJA-FIDALGO, C. Rat paw edema and leukocyte immigration induced by plants lectins. **Inflammation Research**, v.38, p. 48-54, 1993.

BEVILACQUA, R.G.; MODOLIN, M.L.A Cicatrização. In: _____. Aun, F.; Bevilacqua, R.G. Manual de cirurgia. 1a ed. São Paulo. E.P.U (Editora Pedagógica Universitária Ltda.), 1995. Cap. 1, p. 1-17.

BRIKEDAL-HANSEN, H. Role of matrix metalloproteinases in human periodontal disease. **Journal. Periodontal**, v.64, p. 474-484, 1993.

CALVETE, J.J.; THOLE, H.H.; RAIDÁ, M.; URBANKE, C.; ROMERO, A.; GRANGEIRO, T.B.; RAMOS,M.V.; ROCHA, I.M.A.; GUIMARÃES, F.N.; CAVADA, B.S. Molecular

characterization and crystallization of Diocleinae lectins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1430, p. 367-375, 1999.

CARMELIET, P.; COLLEN, D. Gene targeting and gene transfer studies of the plasminogen/plasmin system: implications in thrombosis, hemostasis, neointima formation and atherosclerosis. **FASEB Journal**, v.9, p. 934-938, 1995.

CARVALHO, P. T. C. Análise da cicatrização de lesões cutâneas através da espectrofotometria: Estudo experimental em ratos diabéticos. 2002, 72f. Dissertação (Mestrado em Interunidades em Bioengenharia) – Universidade de São Paulo, São Paulo.

CAVADA, B.S.; SANTOS, C.F.; GRANGEIRO, T.B.; NUNES, E.P.; SALES, P.V.P.; RAMOS, R.L. DE SOUSA, F.A.M.; CRISOSTOMO, C.V.; CALVETE, J.J. Purification and characterization of a lectin from seeds of *Vatairea macrocarpa* Duke, **Phytochemistry**, v.49. n.3, p. 675-680, 1998.

CAVADA, B.S.; BARBOSA, T.; ARRUDA, S.; GRANGEIRO, T.B.; BARRAL-NETTO, M. Revisiting proteus: do minor changes in lectin structure matter in biological activity Lesson and biotechnological uses of the Diocleinae subtribe lectins, **Current Opinion and Peptide Science**, v. 2, p.123-135, 2001.

CLARK, R.A.F. Cutaneous tissue repair: basic biologic considerations. I. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v.13, n.5 Pt 1, p.701-725, 1985.

COLOUMBE, P.A. Wound epithelialization: accelerating the pace of discovery. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 37, p. 219-230, 2003.

CORREIA, M.T.S.; COELHO, L.C.B.B. Purification of a glucose/mannose specific lectin isoform 1, from seeds of *Cratylia mollis* Mart (Camaratu bean). **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 55, p. 261-273, 1995.

DE NARDI, A.B.; RODASKI, S.; SOUSA, R. S.; BAUDI, D.L.K.; CASTRO, J.H.T. Cicatrização secundária em feridas dermoepidérmicas tratadas com ácidos graxos essenciais,

Vitaminas A e E, lecitina de soja e iodo polivinilpirrolidona em cães. **Archives of Veterinary Science**, v. 9, n.1, p. 1-16, 2004.

DIAZ, P.H.; GONZALEZ, O.M.; VELEZ, Y.R.P.; BAEZ, F.A.G. Aplicaciones de Las Lectinas. **Revista Cubana de Hematología, Immunología y Hemoterapia**, v.15, n.2, p.91-95, 1999.

DIEGELMANN, R.F.; EVANS, M. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. **Frontiers Bioscience**, v. 9, p. 283-289, 2004.

DI STASI, L.C. Plantas medicinais: arte e ciência. Um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo. UNESP. 1996. 230p.

FAZIK, M. J.; ZITE, J.A ; GOSLEN, J.B. Cicatrização das Feridas. In: COLEMAN, W.P. e HANKE, W. Cirurgia Cosmética Princípios e Técnicas, 2ed., Rio de Janeiro: Revinter, 2000, cap.3, p. 18-38.

FREIRE, M.G.; DE SOUZA, I.A.; SILVA, A.C.; MACEDO, M.L.; LIMA, M.S.; TAMASHIRO, W.M.; ANTUNES, E.; MARANGONI, S. Inflammatory responses induced in mice by lectin from *Talisia esculenta* seeds. **Toxicon**, v.42, n.3, p.275-280, 2003.

GABOR, F.; KLAUSEGGER, U.; WIRTH, M. The interaction between wheat germ agglutinin and other plant lectins with prostate cancer cells Du-145. **International Journal of Pharmaceutics**, v.221, n.1-2, p. 35-47, 2001.

GEARING, A.J.H.; BECKETT, P.; CHRISTODOULOU, M. et al. Processing of tumor necrosis factor- α precursor by metalloproteinases. **Nature**, v. 370, p. 555-557, 1994.

GRINNEL, F. Fibroblast biology in three-dimensional collagen matrices. **Trends in Cell Biology**, v.13, p. 264-269, 2003.

GOMES, J.C.; ROSSI, R.R.; CAVADA, B.S.; MOREIRA, R.A.; OLIVEIRA, J.T.A. Histamine release induced by glucose (mannose)-specific lectins isolated from Brazilian beans, comparison with concanavalina A. **Agents Actions**, v.41, n.3-4, p.132-135, 1994.

HAKKINEN, L.; UITTO, V.J.; LARJAVA, H. Cell biology of gingival wound healing. **Periodontology**, v. 24, p. 127-152, 2000.

HUBBEL, J. A. Biomaterials in tissue engineering. **Bio/Technology**, v. 13, n. 6, p. 565-576, 1995.

HUNT, T. K.; GOODSON, W. H. Cicatrização das Feridas. In: Way, L. W. Cirurgia, Diagnóstico e Tratamento. 5ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 8, p. 67-75, 1993.

IYER, V.R; EISEN, M.B.; ROSS, D.T., SCHULER, G.; MOORE, T.; LEE, J.C.F.; TRENT, J.M.; STAUDT, L.M.; HUDSON, J. JR.; BOGUSKI, M.S.; LASHKARI, D.; SHALON, D.; BOTSTEIN, D.; BROWN, P.O. The transcriptional program in the response of human fibroblasts to serum. **Science**, v.283: p. 83-87, 1999.

KAHARI, V.M.; SAARIALHO-KERE, U. Matrix metalloproteinases in skin. **Experimental Dermatology**, v.6, p.199-213, 1997.

KARUKONDA, S.R.K.; FLYNN, T.C.; BOH, E.E.; MCBURNEY, E.I., RUSSO, G.G.; MILLIKAN, L.E. The effects of drugs on wound healing. **International Journal of Dermatology**, v. 39, p. 250-257, 2000.

KENNEDY, J.F.; PAIVA, P.M.G.; CORELLA, M.T.S; CAVALCANTI, M.S.M; COELHO, L.C.C.B. Lectins, versatile proteins of recognition: a review. **Carbohydrate Polymers**, v.26, p.219-230, 1995.

KOIKE, T.; BEPPU, H.; KUZUYA, H.; MARUTA, K.; SHIMPO, K.; SUZUKI, M.; TITANI, K.; FUJITA, K. A 35 kDa mannose-binding lectin with hemagglutinating and mitogenic activities from "Kidachi Aloe" *Aloe arborescens* Miller var. *natalensis* Berger, **The Journal of Biochemistry**, v.118, n.6, p.1205-1210, 1995.

LI, J.; CHENG, J.; KISNER, R. Pathofisiology of acute wound healing. **Clinics in dermatology**, v.25, p. 9-18, 2007.

LIS, H.; SHARON, N. Lectins: carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition, **Chemical Review**, v. 98, n.2, p. 637-674, 1998.

LOPES, F.C.; CAVADA, B.S.; PINTO, V.P.T.; SAMPAIO, A.H.; GOMES, J.C. Differential effect of plant lectins on mast cells of different origins. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.38, n.6, p.935-941, 2005.

LORENA, D.; ACHIO, K.; COSTA, A.M.A.; DESMOULIÈRE, A. Normal scarring: importance of myofibroblasts. **Wound Repair and Regeneration**, v.10, n.2, p.86-92, 2002.

MACIEL, E.V.; ARAÚJO-FILHO, V.S.; NAKAZAWA, M.; GOMES, Y.M.; COELHO, L.C.; CORREIA, M.T. Mitogenic activity of *Cratylia mollis* lectin on human lymphocytes. **Biologicals**, v.32, n.1, p.57-60, 2004.

MANDELBAUM, S.H.; DI SANTIS, E.P.; MANDELBAUM, M.H.S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares- Parte I. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 78, n. 4, p. 393-410, 2003.

MANNEL, D.N.; BECKER, H.; GUNDT, A.; KIST, A.; FRANZ, H. Induction of tumor necrosis factor expression by a lectin from *Viscum album*. **Cancer Immunology and Immunotherapy**, v.33, n.3, p.177-182, 1991.

MARTIN, P. Wound healing- aiming for a perfect skin regeneration. **Science**, v. 276, p. 75-81, 1997.

McANULTY, R.J. Fibroblasts and myofibroblasts: their source, function and role in disease. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v.xxx, p.xxx-xxx, 2006.

MONACO, J.L.; LAWRENCE, W.T. Acute wound healing: an overview. **Clinic Plastic Surgery**, v.30, p. 1-12, 2003.

MOREIRA, R.A.; CAVADA, B.S. Lectins from *Canavalia brasiliensis* Mart. Isolation, characterization and behavior during germination. **Biologia Plantarum**, v. 26, p.113-120, 1984.

MOREIRA, R.R.D.; CARLOS, I.Z.; VILEGAS, W. Release of intermediate reactive hydrogen peroxide by macrophage cells activated by natural products. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.24, n.2, p. 201-204, 2001.

MURPHY, G. E DOCHERTY, A.J.P. The matrix metalloproteinases and their inhibitors. **American Journal of Respiratory and Cell Molecular Biology**, v. 7, p. 120-125, 1992.

MUTSAERS, S.E.; BISHOP, J.E.; MCGROUTHER, G.; LAURENT, G.J. Mechanisms of tissue repair: from wound healing to fibrosis. **International Journal of Biochemistry and Cell biology**, v.29, n.1, p.5-17, 1997.

NAGAPPA, A. N., CHERIYAN, B. Wound healing activity of the aqueous extract of *Thespesia polpunea*. **Fitoterapia**, v.72, n.5 p.503-506, 2001.

NG, T.B.; YU, Y.L. Isolation of a novel heterodimeric agglutinin from rhizomes of *Smilax glabra*, the Chinese medicinal material tufuling. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v.33, n.3, p.269-277, 2001.

NOGUEIRA, R.M.B.; KITAMURA, E.A.; AGUIAR, D.M. Estudo clínico da reparação tecidual de feridas cutâneas tratados com papaína e colagenase. **Nosso Clínico**, Ano 8, n.43, jan/fev, 2005.

NOORMOHAMED, S.E.; KUMAR, V.; MIN, D.I. Evaluation of traditional “compound R” for the treatment of thermal burn wounds in fuzzy rats. **Journal of Burn Care e Rehabilitation**, v.15, n.6, p. 519-522, 1994.

PARK, J. E. P.; BARBUL, A. B. Understanding the role of immune regulation in wound healing. **The American Journal of Surgery**, v. 187, p. 115-165, 2004.

PARKS, W.C. Matrix metalloproteinases in repair. **Wound Repair and Regeneration**, v.7, p. 423-432, 1999.

PEREIRA, A.M.; ARIAS, M.V.B. Manejo de feridas em cães e gatos: uma revisão. **Clínica Veterinária**, ano VII, n. 38, 2002.

RATANAPO, S.; NGAMJUNYAPORN, W.; CHALAVATNATOL, M. Interaction of a mulberry leaf lectin with a phytopathogenic bacterium, *P. syringae pv mori*. **Plant Science**, v.160, n.4, p.739-744, 2001.

RATNER, B.D.; BRYANT, S.J. BIOMATERIALS: Where we have been and where we are going. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v.6, n.1, p.41-75, 2004.

REED, M.J.; PUOLAKKAINEN, P.; LANE, T.F.; DICKERSON, D.; BORNSTEIN, P.; SAGE, E.H. Differential expression of SPARC and thrombospondin 1 in wound repair: immunolocalization and in situ hybridization. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v.41, n.10, p.1467-1477, 1993.

RODRIGUEZ, D.; CAVADA, B.S.; ABREU-DE-OLIVEIRA, J.T.; DE-AZEVEDO-MOREIRA, R.; RUSSO, M. Differences in macrophage stimulation and leukocyte accumulation in response to intraperitoneal administration of glucose/mannose-binding plant lectins. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.25, n.8, p.823-826, 1992.

RÜDIGER, H. Plant lectins-More than just tools for glycoscientists: Occurrence, structure, and possible functions of plant lectins. **Acta anatomica**, v. 161, p. 130-152, 1998.

SANTORO, M.M.; GAUDINO, G. Cellular and molecular facets of keratinocyte reepithelization during wound healing. **Experimentall. Cell Research**, v.304, p. 274-286, 2005.

SANZ-APARÍCIO, J.; HERMOSO, J.; GRANJEIRO, T.B.; CALVETE, J.J.; CAVADA, B.S. The crystal structure of *Canavalia brasiliensis* lectin suggests a correlation between its quaternary conformation and its distinct lectin biological properties from Concanavalina A. **FEBS Letters**, v.405, n.1, p. 114-118, 1997.

SHARON, N.; LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**, v.14, n.11, p.53R-62R, 2004.

SINGER, A.J.; CLARK, R.A.F.; Cutaneous wound healing. **The New England Journal of Medicine**, v.341, n.10, p.738-746, 1999.

SILVA, J. G. et al. Correção de cicatrizes. In: MELEGA, J.M. Cirurgia Plástica Reparadora e Estética, São Paulo: Medsi, 2000.

STADELMAN, W.K.; DIGENIS, A.G.; TOBIN, G.R. Physiology and healing dynamics of chronic cutaneous wounds. **The American Journal of Surgery**, v. 176, (supl. 2A), p. 26S-38S, 1998.

SONEJA, A.; DREWS, M.; MALINSKI, T. Role of nitric oxide, nitroxidative and oxidative stress in wound healing. **Pharmacological Reports**, v. 57, p. 108-119, 2005.

SPECTOR, M. Biomaterials. In: ACHAUER, B. et. al. Plastic surgery: indications, operations, outcomes. St. Louis: Mosby Year Book, Inc., cap. 19, p.239-259. 2001.

TIZARD, I. Imunologia veterinária: uma introdução. Cap. 4, macrófagos: a segunda população de células fagocíticas, Quinta edição, Rocca: são paulo, 1998.

TRIGUEROS, V.; LOUGARRE, A.; ALI-AHMED, D.; RAHBÉ, Y.; GUILLOT, L.C.; FOURNIER, D.; PAQUEREAU, L. *Xerocomus chrysesteron* lectin: identification of new pesticidal protein. **Biochimica and Biophysica Acta**, v.1621, n.3, p.292-298, 2003.

TSIROGIANNI, A. K.; MOUTSOPOULOS, N.M.; MOUTSOPOULOS, H.M. Wound healing: immunological aspects. **Injured, International Journal of The Care of The Injured**, v. 37S, p. S5-S12, 2006.

VAN DAMME, E.J.; BARRE, A.; BEMER, V.; ROUGE, P.; VAN LEUVEN, F.; PEUMANS, W.J. A lectin and a lectin-related protein are the two most prominent proteins in

the bark of yellow wood (*Cladrastis lutea*). **Plant Molecular Biology**, v.29. n.3, p.579-598, 1995.

VASSALI, J.D.; SAURAT, J.H. Cuts and scrapes? Plasmin heals! **Nature Medicine**, v.2, p.284-285, 1996.

WERNER, S.; GROSE, R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. **Physiology Review**, v.83, p. 835-870, 2003.

WITTE, M.B.; BARBUL, A. General principles of wound healing. **Surgical clinical of North American**, v. 77, p. 509-528, 1997.

WOESSNER JR. J.F. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. **FASEB Journal**, v.5, n.8, p. 2145-2154, 1991.

6 ARTIGO CIENTÍFICO

Perfil de proteases e avaliação histopatológica de lesões cutâneas experimentais em camundongos tratadas com a lectina isolada das sementes de *Canavalia brasiliensis*

Proteases profile and hysthopathological analysis of the treatment of cutaneous healings with lectin from *Canavalia brasiliensis* seeds

Flávio de Oliveira Silva ^{I, VII}, Rosângela Vidal de Souza Araújo ^{II, VII}, Giuliana Viegas Schirato ^{I, VII}, Edson Teixeira de Holanda ^{III}, Mário Ribeiro de Melo Júnior ^{VII}, Benildo de Sousa Cavada ^{IV}, José Luiz de Lima-Filho ^{V, VII}, Ana Maria dos Anjos Carneiro-Leão ^{VI}, Ana Lúcia Figueiredo Porto ^{VI, VII*}

RESUMO

O objetivo desse estudo foi determinar o perfil de proteases e avaliar clínica e histopatologicamente o efeito do tratamento tópico de feridas cutâneas com a lectina isolada das sementes da *Canavalia brasiliensis* (ConBr) livre e conjugada com o seu açúcar específico. Para isso, lesões cirúrgicas foram produzidas na região dorsal de camundongos, divididos em grupos, de acordo com o tratamento que se segue: NaCl (150mM), manose (0,1M), ConBr (10µg) e ConBr/manose (10µg em solução fisiológica com manose 0,1M). Amostras da área lesada foram coletadas para determinação do perfil de proteases e análise histopatológica (2º, 7º e 12º dias pós-operatório). O perfil das proteínas realizado através de eletroforese SDS-PAGE demonstrou a presença de proteínas com peso molecular de 67 kDa em todos os grupos, sugerindo a presença da metaloproteinase-2 (MMP-2) nos homogenatos obtidos a partir das lesões cutâneas. Entre os grupos estudados, o ConBr/manose apresentou a

^I Programa de Pós-graduação em Ciência Veterinária, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Dois Irmãos, Recife, Pernambuco, Brasil.

^{II} Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, Brasil.

^{III} Curso de Medicina, Campus de Sobral, Universidade Federal do Ceará

^{IV} Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brasil.

^V Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco

^{VI} Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n. Dois Irmãos, Recife-PE, CEP: 52171-900.

^{VII} Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami - LIKA, Universidade Federal de Pernambuco.

*analuporto@yahoo.com.br. Autor para correspondência.

maior atividade proteolítica no 12º dia de pós-operatório, seguido do grupo ConBr. O grupo ConBr apresentou sinais inflamatórios menos intensos que os outros grupos avaliados, tendo evoluído com maior percentual de contração, contudo, o grupo ConBr/manose apresentou melhor padrão de organização das fibras colágenas. A lectina isolada das sementes da *Canavalia brasiliensis* favoreceu o processo cicatricial das lesões cutâneas experimentais, tendo apresentado um melhor efeito sob o ponto de vista histopatológico quando usada em associação com a manose.

Palavras-chave: *Canavalia brasiliensis*, cicatrização, lectinas, metaloproteinases, reparo tecidual.

ABSTRACT

The objective of the present study was determining the proteases profile and evaluate clinically and histopathological effect of the topic treatment of cutaneous healings with free and conjugate lectin of *Canavalia brasiliensis* (ConBr) and their specific sugar. For conclude the objective, cirurgic lesions were produced on the dorsal regions of the mice, divided in groups, according with the following treatment: 10µg ConBr, 10µg ConBr/manose in physiologic solution with 0,1M manose, 150mM NaCl, 0,1M manose. Samples of the injured area had been collected for determination of the profile of proteases and histopathological analysis (2nd, 7th e 12th days after the surgery). The electrophoresis SDS-PAGE demonstrated the presence of proteins with molecular weight of 67 KDa in all groups, that is, active form of MMP-2. Among the studied groups, ConBr/manose was which presented the highest proteolytic activity on the 12th day post surgery, followed of the ConBr group. The group ConBr presented inflammatory less intense than the other groups evaluated, evolution with the highest percent of wound contraction, however the group ConBr/manose presented the

best standard regarding the organization of the collagen fibres on the 12 day after the surgery. The ConBr favored the wound healing process of the experimental cutaneous lesions, has been presented the best effect under the histopathological point of view when used in association with the manose.

Key words: *Canavalia brasiliensis*, lectins, metalloproteinases, wound healing, wound repair.

INTRODUÇÃO

A pele funciona como uma barreira protetora contra os mais variados tipos de agentes agressores presentes no ambiente, sendo fundamental para a manutenção da homeostase. Qualquer alteração na integridade da pele pode desencadear condições patológicas como infecção, desidratação e prejuízo no balanço eletrolítico. Um processo de cicatrização eficiente é de grande importância para o bem-estar do paciente (BAUM & ARPEY, 2005).

O processo cicatricial envolve uma complexa seqüência de eventos celulares e bioquímicos com o objetivo de restaurar a integridade tecidual após o trauma. Este processo caracteriza-se pela homeostase, inflamação, formação do tecido de granulação e remodelação da matriz extracelular (MEC) (PARK & BABUL, 2004).

A degradação da MEC é uma característica essencial do reparo e remodelação durante a cicatrização de lesões cutâneas. As metaloproteinases (MMP) são uma família de endopeptidases zinco-dependentes que coletivamente são capazes de degradar todos os componentes da matrix extracelular (GEARING et al., 1994). Estas enzimas podem ser produzidas por vários tipos de células da pele como fibroblastos, células endoteliais, mastócitos e polimorfonucleares, tendo uma importante função na remodelação proteolítica da

MEC em várias situações fisiológicas, incluindo: desenvolvimento tecidual, morfogênese, reparo tecidual e angiogênese (KÄHÄRI & SAARIALHO-KERE, 1997).

Dubois et al (1998) demonstraram que a lectina da *Canavalia ensiformis* (Con A) induz a produção da MMP-9 por linfócitos *in vitro*, esta protease em associação com a MMP-2 é fundamental para o processo cicatricial. Diante disso, torna-se importante a análise da influência de outras lectinas sobre a atividade das MMP.

Em estudos recentes, proteínas bioativas vêm sendo utilizadas na terapêutica médica (ANDRADE, 2004). As lectinas são (glico)proteínas de origem não imune que se ligam de maneira específica e reversível a carboidratos, estando amplamente distribuídas na natureza (PEUMANS & VAN DAMME, 1995), e são consideradas moléculas que reconhecem e decifram a informação contida nos oligossacarídeos presentes na superfície celular (RINI, 1995). Estas glicoproteínas, em particular, as de origem vegetal, são consideradas importantes ferramentas nos estudos em glicobioquímica e glicobiologia (RUDIGER, 1998). Entre as lectinas mais estudadas de plantas, estão principalmente as da família Leguminosae. Lectinas dessa família representam um grupo de proteínas similares estruturalmente, porém com diferentes especificidades a carboidratos. A lectina extraída das sementes de *Canavalia brasiliensis* caracteriza-se por se ligar a D-glucose/D-manose.

A atividade biológica da ConBr tem sido investigada em diversos modelos experimentais (CAVADA et al., 2001). Entre as atividades biológicas dessa lectina estão a indução *in vitro* da proliferação de linfócitos com produção de interferon- γ (BARRAL-NETTO et al., 1992), liberação de histamina por mastócitos (GOMES et al., 1994), produção de óxido nítrico *in vitro* e *in vivo* (ANDRADE et al., 1999) e indução de apoptose celular (BARBOSA et al., 2001).

Com base no fato de que as lectinas de leguminosas estimulam a produção de metaloproteinases importantes para o processo cicatricial, decidimos avaliar o efeito do

tratamento de lesões cutâneas com a lectina das sementes da *Canavalia brasiliensis* (ConBr) livre e conjugada com o seu açúcar específico, avaliando a atividade proteolítica e analisando as lesões sob o ponto de vista clínico e histopatológico.

MATERIAL E MÉTODOS

Camundongos *Swiss* machos, com 10 semanas de idade, pesando $40,0 \pm 5,0$ g foram criados e mantidos no Biotério do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco. Os animais foram alocados em gaiolas individuais, permanecendo em macroambiente controlado (fotoperíodo de 12h claro/escuro, temperatura $23 \pm 2^\circ\text{C}$ e umidade $55 \pm 10\%$) com fornecimento de água e ração à vontade.

A lectina de *Canavalia brasiliensis* (ConBr) foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Benildo de Souza Cavada. A lectina liofilizada foi solubilizada em solução NaCl 150mM até obter a concentração final de $100\mu\text{g/mL}$. Também foram preparadas soluções com a lectina ConBr conjugada com o seu açúcar específico, neste caso, a solução de lectina em salina contendo manose 0,1M foi incubada a 37°C por 30 minutos. Após a dissolução, as soluções foram filtradas em membranas $0,22\mu\text{m}$ e, posteriormente, armazenadas em frascos estéreis e estocadas a -4°C até a sua utilização.

O procedimento cirúrgico experimental e a avaliação clínica das lesões foram realizados de acordo com Schitrato et al. (2006). Os animais ($n=25/\text{grupo}$) foram divididos de acordo com o tratamento experimental empregado: ConBr ($10\mu\text{g}$ em solução salina), ConBr/manose ($10\mu\text{g}$ em solução salina contendo manose 0,1M), manose (0,1M em solução salina) e NaCl (0,15M). Cada lesão recebeu diariamente $100\mu\text{L}$ das soluções testadas. Diariamente, cada lesão foi avaliada clinicamente e mensurada por auxílio de um paquímetro.

No 2º, 7º e 12º dias pós-operatório (P.O.), os animais (n=10/grupo/tempo) foram anestesiados e amostras de tecido da área lesada foram retiradas. Imediatamente após a retirada do tecido, as amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e pulverizadas. Em seguida, as amostras de pele foram homogeneizadas como descrito por NEELY et al (1992). As amostras foram centrifugadas a 6000 x g por 30 minutos e os sobrenadantes utilizados para análise de metaloproteinases.

A atividade proteolítica foi realizada utilizando-se azocolágeno como substrato segundo método descrito por Chavira et al. (1984) modificado, pela mudança no valor do pH de 7,8 para 7,2. O azocolágeno foi suspenso em Tris-HCl 50mM pH 7,2, CaCl₂ 1mM em uma concentração final de 5mg/mL. O sistema de reação foi constituído por 150µL do homogenato de tecido de pele, 150µL de solução tampão Tris-HCl 50mM pH 7,2, CaCl₂ 1mM e 270µL da solução de azocolágeno (5mg/mL). O sistema de reação foi incubado a 37°C sob agitação constante. Após 18h de incubação, a reação foi interrompida por centrifugação a 10.000x g por 15 minutos a 4°C. A absorbância do sobrenadante foi lida a 520nm. Uma unidade de atividade proteolítica foi descrita como sendo a variação de absorbância de 0,01 durante 18 horas de reação.

Os homogenatos obtidos foram submetidos à técnica de eletroforese SDS-PAGE, realizada em gel gradiente de 10% de poliacrilamida de acordo com o método de Laemmli (1970). Utilizando-se como padrão de peso molecular anidrase carbônica (30 kDa), ovoalbumina (43 kDa), e albumina bovina sérica (67 kDa).

Com os camundongos anestesiados conforme previamente descrito, amostras do tecido lesionado foram coletadas no 2º, 7º e 12º dias de P.O., com o objetivo de retirar fragmentos da área para realizar a análise histopatológica. As amostras foram submetidas ao processamento histológico de rotina e incluídas em parafina. Após microtomia, os cortes foram corados pelo Tricrômico de Masson.

As áreas foram submetidas inicialmente ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk ($p < 0,05$) para se avaliar a adequação dos dados à análise paramétrica. Constatada a distribuição normal dos dados, estes foram comparados aos pares, utilizando-se o Teste t e considerando-se um nível de significância de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Lectinas têm sido descritas como potentes imunomoduladores por induzir a ativação linfocitária e produção de citocinas. A lectina de *Canavalia brasiliensis* induz *in vitro* a proliferação linfocitária com produção de interferon- γ , GM-CSF (Fator Estimulante da Colônia de Macrófagos), IL-4 (Interleucina-4), IL-10 (Interleucina-10) e TNF- α (Fator de Necrose tumoral-alfa) (CAVADA et al., 2001). O TNF- α é mitogênico e quimiotático para células endoteliais que migram para o leito da lesão originando novos vasos sanguíneos (MUTSAERS et al., 1997). A neoangiogênese é fundamental para a evolução do processo cicatricial, pois, os novos vasos formados fornecerão os nutrientes necessários para as células presentes no local da lesão.

Algumas lectinas ligadoras de glucose-manose demonstraram atividade antiinflamatória quando injetadas intravenosamente em ratos. A lectina de *Canavalia brasiliensis* embora pertença ao mesmo grupo dessas lectinas, não possui atividade antiinflamatória quando injetada por via intravenosa (ASSREUY et al., 1997). Contudo, nesse estudo, onde as lesões foram tratadas através da aplicação tópica da lectina, os sinais inflamatórios observados durante a avaliação clínica (edema) foram menos intensos no grupo ConBr, quando comparados aos demais grupos experimentais (Figura 01).

Estudos indicam, que durante a fase inflamatória as lectinas induzem a produção de óxido nítrico *in vitro* e *in vivo* (ANDRADE et al., 1999). O óxido nítrico é fundamental para

o processo inflamatório atuando como vasodilatador, antimicrobiano e promovendo a permeabilidade vascular. Possui também efeito pró-inflamatório atuando como quimioatraente para citocinas como a Interleucina-1, um potente modulador da proliferação, recrutamento e diferenciação de queratinócitos, TGF- β -1 (Fator de Crescimento de Fibroblastos-1), monócitos e neutrófilos, favorecendo a angiogênese e auxiliando a ativação de fibroblastos (SONEJA et al., 2005).

Durante a fase inflamatória, ou seja, até o 2º dia P.O. observou-se no grupo ConBr, uma menor degradação do azocólageno, que poderia ser por um menor afluxo de células inflamatórias ao local da lesão, uma vez que os sinais inflamatórios foram menos intensos nesse grupo, pois, algumas lectinas *in vitro* são capazes de ativar ou inibir a atividade de algumas gelatinases (DUBOIS, 1998). O perfil das proteínas realizado através de eletroforese SDS-PAGE demonstrou a presença de proteínas com peso molecular de 67 kDa em todos os grupos, sugerindo a presença da metaloproteinase-2 (MMP-2) nos homogenatos obtidos a partir das lesões cutâneas (Figura 02).

Segundo Ovington (2007), o comportamento normal destas enzimas seria um pico enzimático durante a fase inflamatória da cicatrização, e então um declínio no estágio de aparecimento de tecido de granulação e subsequentemente novo tecido epitelial no ferimento. Neste estudo, não foi observado pico de atividade enzimática em nenhum grupo experimental durante a fase inflamatória, no entanto, o grupo ConBr/manose durante esta fase obteve um comportamento na atividade enzimática mais elevado, quando comparado aos demais grupos, fato este que poderia explicar a melhor evolução deste grupo no decorrer do experimento (Figura 03). Apesar dos resultados da diferença observada na atividade colagenolítica, os grupos foram semelhantes quanto aos achados histopatológicos observados (Figura 04).

A lectina ConBr estimula o afluxo de macrófagos quando injetada por via intraperitoneal em camundongos C3H/HeJ (RODRIGUEZ et al., 1992). Os macrófagos são as

principais células da reação inflamatória. Muitos fatores de crescimento secretados por macrófagos influenciam a proliferação celular. Como exemplos, o TGF- α (fator de crescimento transformante- α) tem um importante papel na migração de queratinócitos e reepitelização. TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3 promovem a migração de fibroblastos e células endoteliais e a deposição de matriz extracelular por fibroblastos durante a formação do tecido de granulação (LI et al., 2007).

Durante a fase de fibroplasia (7º dia P.O), no grupo ConBr observou-se que a utilização da lectina nas lesões cutâneas favoreceu a evolução da cicatrização, com um maior afluxo de fibroblastos ao leito da ferida e desenvolvimento do tecido de granulação com padrão fibrovascular, este padrão de organização também foi observado nos grupos ConBr/manose e manose, porém o grupo ConBr destacou-se por apresentar uma crosta presente no leito da ferida (Figura 05). A crosta serve como uma matriz provisória através da qual as células envolvidas no reparo tecidual migram durante o processo cicatricial (MARTIN, 1997).

Sell e Costa (2003) demonstraram que lectinas são capazes de diminuir a proliferação de fibroblastos *in vitro*. A análise histopatológica do grupo ConBr sugere que a lectina isolada da *Canavalia brasiliensis* não exerceu influência negativa sobre a migração e proliferação fibroblástica. Durante a cicatrização de lesões o movimento de fibroblastos no leito da ferida promove a formação da nova matriz extracelular com deposição de colágeno (SUMITRA et al., 2005).

Quanto ao perfil da atividade colagenolítica na fase de fibroplasia, os grupos ConBr, NaCl e manose apresentam aumento desta atividade em relação a fase inflamatória, porém no grupo ConBr/manose, observou-se um declínio desta atividade.

Nesse estudo, observou-se que houve diferenças estatisticamente significativas entre as áreas médias das feridas dos grupos ConBr e os demais grupos analisados na fase de

fibroplasia sugerindo que a lectina da *Canavalia brasiliensis* quando aplicada topicamente promove a ativação de células envolvidas no processo cicatricial, favorecendo a evolução do mesmo. A diferença observada entre os grupos ConBr e ConBr/manose, durante a fase de fibroplasia, sugere um possível envolvimento do sítio ligador de carboidratos na ativação das células envolvidas na evolução do processo cicatricial na fase de fibroplasia.

Sugere-se que o passo inicial da interação entre as lectinas e as células seja a ligação com carboidratos da superfície celular. Estudos realizados por Freire et al (2003), Alencar et al (2003), demonstraram a diminuição dos efeitos biológicos das lectinas analisadas quando as mesmas foram conjugadas com os seus respectivos açúcares específicos. Contudo em nossos achados histopatológicos verifica-se que na fase de remodelação (12º dia P.O.), a lectina ConBr conjugada a manose apresentou melhor padrão de organização das fibras colágenas (Figura 06), o que pode está relacionado com a maior atividade proteolítica observada neste grupo, diferentemente dos demais grupos, onde foi observado um declínio desta atividade. Vale ressaltar que alguns autores indicam a presença de sítios hidrofóbicos adicionais nas lectinas (BARONDES, 1988), os quais podem estar envolvidos em alguns dos seus papéis biológicos, inclusive podendo ser esta uma explicação para a atividade de lectinas, mesmo com seus sítios ligadores de carboidratos ocupados.

A melhor organização da matriz extracelular pode ter sido devido ao favorecimento da migração dos fibroblastos no leito da lesão como conseqüente aumento na produção das metaloproteinases que nesse período do processo cicatricial são responsáveis pela remodelação do colágeno recém sintetizado, como verificado por Grinnel (2003), as MMP facilitam a migração dos fibroblastos através da matriz extracelular e do leito da lesão.

A lectina isolada das sementes da *Canavalia brasiliensis* favoreceu o processo cicatricial das lesões cutâneas experimentais, tendo apresentado um melhor efeito sob o ponto

de vista histopatológico, quando usada em associação com a manose, que possivelmente está relacionado com a maior atividade colagenolítica observada na fase de remodelação.

COMITÊ DE ÉTICA ANIMAL

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as normas preconizadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal-COBEA e o protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética Animal da Universidade Federal de Pernambuco.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALENCAR, N.M. et al. The galactose-binding lectin from *Vatairea macrocarpa* seeds induces in vivo neutrophil migration by indirect mechanism. *The International Journal Of Biochemistry & Cell Biology*, v.35, p.1674-1681, 2003.

ANDRADE, J.L. et al. Lectin-induced NO production. *Cellular Immunology*, v.194, p.98-102, 1999.

ANDRADE, C.A.S. et al. Antitumor activity of *Cratylia mollis* lectin encapsulated into liposomes. *International Journal of Pharmaceutics* v.278, p.435-445, 2004.

BARBOSA, T. et al. In vivo lymphocyte activation and apoptosis by lectins of the Diocleinae subtribe. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.96, p.673-678, 2001.

BARONDES, S.H. Bifunctional properties of lectins: lectins redefined. *Trends in Biochemical Sciences*, v.13, p.480-482, 1988.

BARRAL-NETTO, M. et al.. Human lymphocyte stimulation by legume lectins from the Diocleae tribe. *Immunology Investment*, v.21, p.297-303, 1992.

-
- BARRAL-NETTO, M. et al. In vivo protective effect of the lectin from *Canavalia brasiliensis* on BALB/c mice infected by *Leishmania amazonensis*. **Acta Tropica**, v.60, p.237-250, 1992.
- BAUM, C.L.; ARPEY, C.J. Normal cutaneous wound healing: clinical correlation with cellular and molecular events. **Dermatology Surgery**, v.31, p.674-686, 2005.
- CAVADA, B.S. et al. Revisiting proteus: Do minor changes in lectin structure matter in biological activity? Lessons from and potential biotechnological uses of the Diocleinae subtribe lectins. **Current Protein and Peptide Science**, v.2, p.123-135, 2001.
- CHAVIRA, R.J. et al. Assaying proteinases with azocoll. **Analytical Biochemistry**, v.136, p.446-450, 1984.
- DUBOIS, B. et al. Regulation of gelatinase B (MMP-9) in leukocytes by plants lectins. **FEBS Letters**, v.427, p.275-278, 1998.
- FREIRE, M.G. et al. Inflammatory responses induced in mice by lectin from *Talisia esculenta* seeds **Toxicon**, v.42, p.275-280, 2003.
- GEARING, A.J.H et al. Processing of tumor necrosis factor- α precursor by metalloproteinases. **Nature**, v.370, p.555-557, 1994.
- GRINNEL, F. Fibroblast biology in three-dimensional collagen matrices. **Trends in Cell Biology**, v.13, p.264-269, 2003.
- GOMES, J.C. et al. Histamine release induced by glucose (mannose)-specific lectins isolated from Brazilian beans comparison with concanavalin A. **Agents Actions**, v.41, p.132-135, 1994.
- IBA, Y. et al. Possible involvement of mast cells in collagen remodeling in the late phase of cutaneous wound healing. **International Immunopharmacology**, v.4, p.1879-1880, 2004.
- KÄHÄRI, V.M.; SAARIALHO-KERE, U. Matrix metalloproteinases in skin, review article. **Experimental Dermatology**, v.6, p.199-213, 1997.

-
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, n.5259, p.680-685, 1970.
- LI, J. et al. Pathophysiology of acute wound healing. **Clinics in Dermatology**, v.25, p.9-18, 2007.
- MARTIN, P. Wound Healing—Aiming for Perfect Skin Regeneration. **Science**, v.276, p.75-81, 1997.
- MUTSAERS, S.E. et al. Mechanisms of tissue repair: from wound healing to fibrosis. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v.29, p.5-17, 1997.
- NEELY et al. Proteolytic activity in human burn wounds. **Wound repair and regeneration**. v.5, p.302-309, 1997.
- NEWELL, K.A. et al. In vivo T-cell activation by staphylococcal enterotoxin B prevents outgrowth of a malignant tumor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.88, p.1074-1078, 1991.
- OVINGTON, L.G. Advances in wound dressings. **Clinics in Dermatology**, v.25, p.33-38, 2007.
- PARK, J. E. P., BARBUL, A. B. Understanding the role of immune regulation in wound healing. **The American Journal of Surgery**, v.187, p.115-165, 2004.
- PEUMANS, W.J., VAN DAMME, E.J.L. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiology**, v.109, p.347-352, 1995.
- QUIOCHO, F.A. Carbohydrate-Binding Proteins: Tertiary Structures and Protein-Sugar Interactions. **Annual Review of Biochemistry**, v.55, p.287-315, 1986.
- RATANAPO, S. et al. Interaction of a mulberry leaf lectin with a phytopathogenic bacterium, *P. Syringae pv mori*. **Plant Science**, v.160, p.739-744, 2001.
- RATNER, B.D., BRYANT, S.J. BIOMATERIALS: Where we have been and where we are going. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v.6, p.41-75, 2004.

RINI, J.M. Lectin Structure. **Annual Reviews of Biophysics and Biomolecular Structure**, v.34, p.551-577, 1995.

RODRIGUEZ, D. et al. Differences in macrophage stimulation and leukocyte accumulation in response to intraperitoneal administration of glucose/manose-binding plant lectins. **Brazilian Journal Of Medical Biological Research**, v.25, p.823-826, 1992.

RÜDIGER, H. Plant lectins-More than just tools for glycoscientists: Occurrence, structure, and possible functions of plant lectins. **Acta anatomica**, v.161, p.130-152, 1998.

SCHIRATO, G.V. et al. O polissacarídeo do *Anacardium occidentale* L. na fase inflamatória do processo cicatricial de lesões cutâneas. **Ciência Rural**, v.36, p.149-154, 2006.

SELL, A.M., COSTA, C.P. Effects of plant lectins on in vitro fibroblast proliferation. **Brazilian Archives of Biology Technology**, v.46, p.349-354, 2003.

SONEJA, A. et al. Role of nitric oxide, nitroxidative and oxidative stress in wound healing. **Pharmacological Reports**, v.57, p.108-119, 2005.

SUMITRA, M. et al. Efficacy of *Buttea monosperma* on dermal wound healing in rats. **The International Journal of Biochemistry e Cell Biology**, v.37, p.566-573, 2005.

WEIS, W.I., DRICKAMER, K. Structural basis of lectin-carbohydrate recognition. **Annual Review Biochemistry**, v.65, p.441-473, 1996.

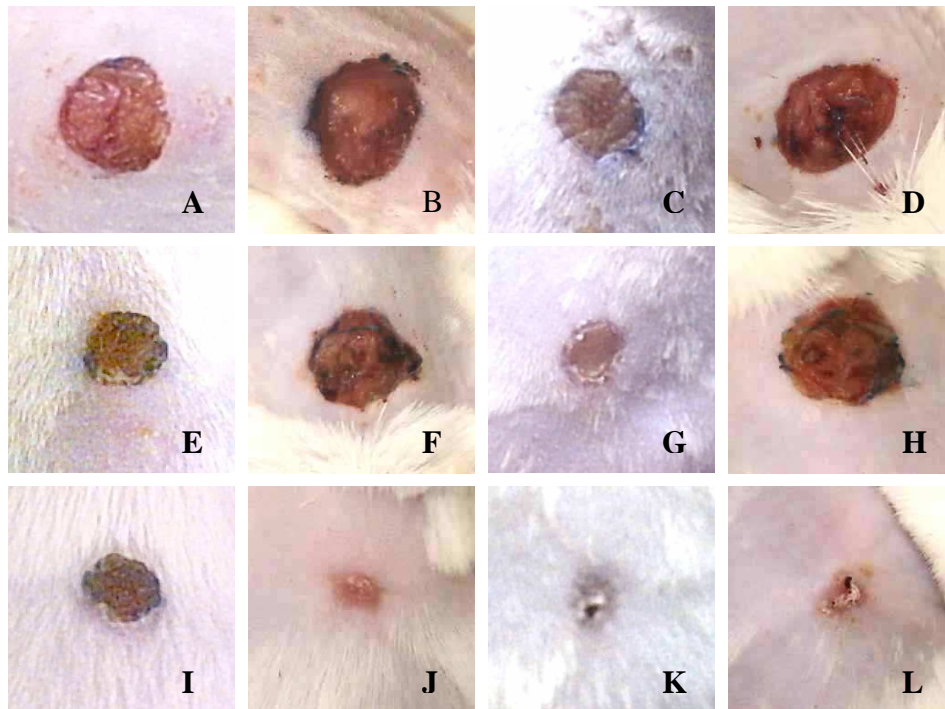


Figura 1. Aspecto macroscópico das lesões cirúrgicas experimentais durante a evolução do processo cicatricial. 2º dia de pós-operatório (P.O.): A, grupo NaCl; B, grupo manose; C, grupo ConBr; D, grupo ConBr/manose. 7º dia P.O.: E, grupo NaCl, F, grupo manose, G, grupo ConBr/manose, H, grupo ConBr. 12º dia P.O.: I, grupo NaCl, J, grupo manose, K, grupo ConBr/manose; L, grupo ConBr.

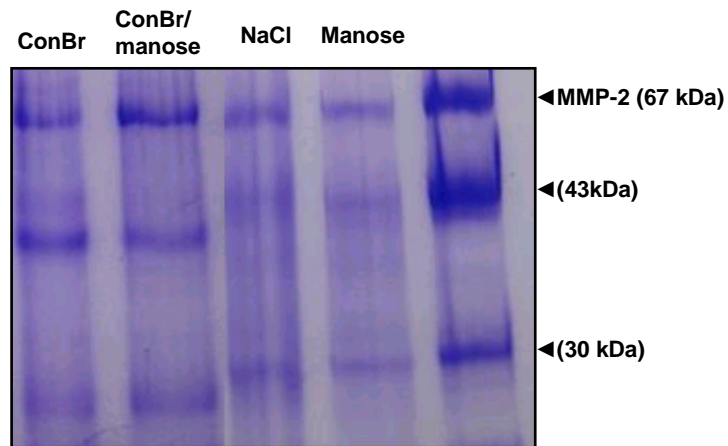


Figura 2. Perfil de proteínas dos homogenatos provenientes das amostras obtidas a partir das lesões cirúrgicas experimentais no 2º, 7º e 12º dias de pós-operatório.

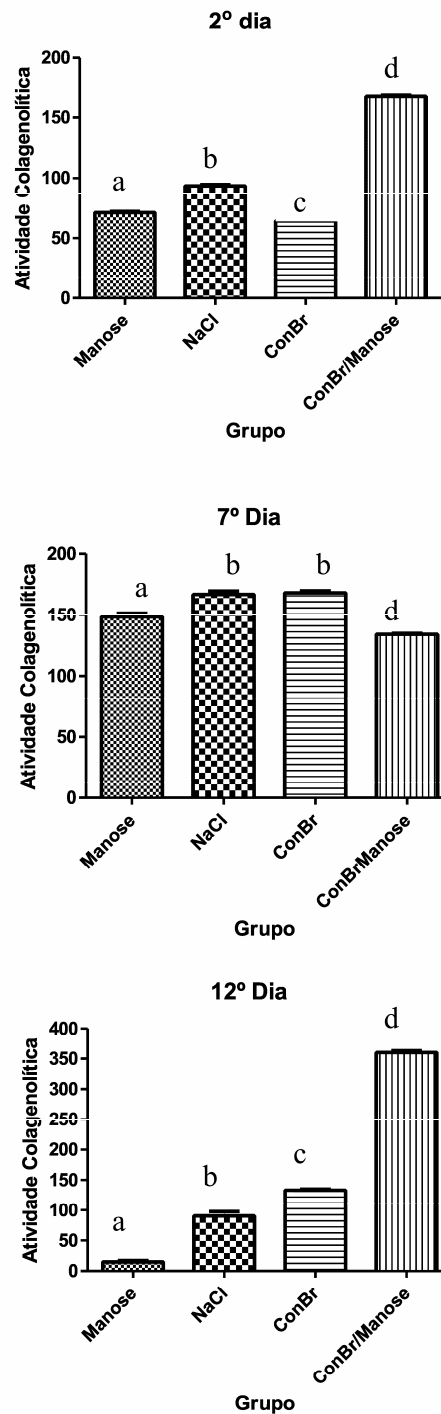


Figura 3. Atividade colagenolítica das proteinases presentes nos homogenatos obtidos das lesões cirúrgicas experimentais dos grupos NaCl, manose, ConBr e ConBr/manose no 2º, 7º e 12º dias de pós-operatório. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas a um nível de significância de 5% .

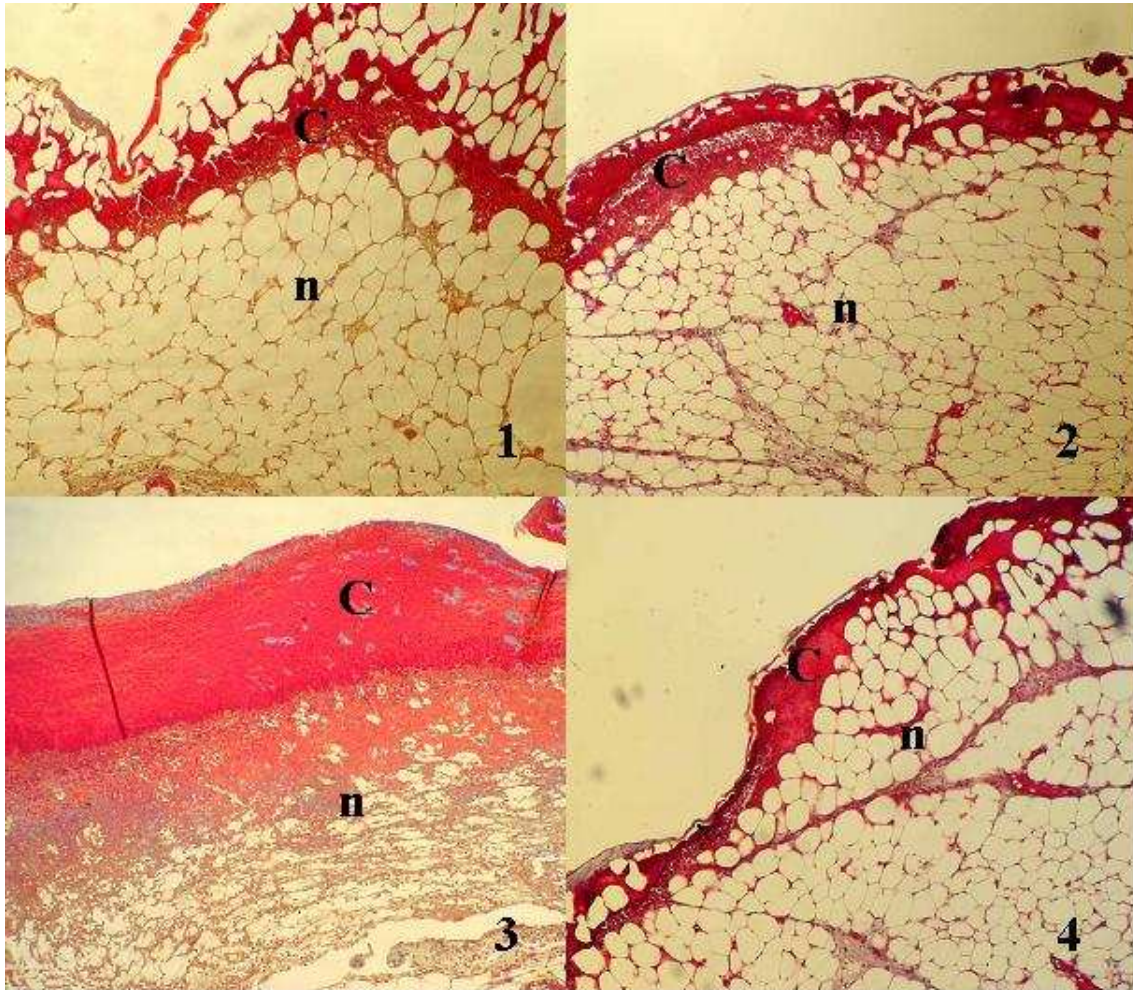


Figura 4. Aspectos histopatológicos das lesões cirúrgicas experimentais no 2º, 7º e 12º dias de pós-operatório. 1, grupo NaCl; 2, grupo manose; 3, grupo ConBr; 4, grupo ConBr/manose. C, crosta, n, neovascularização.

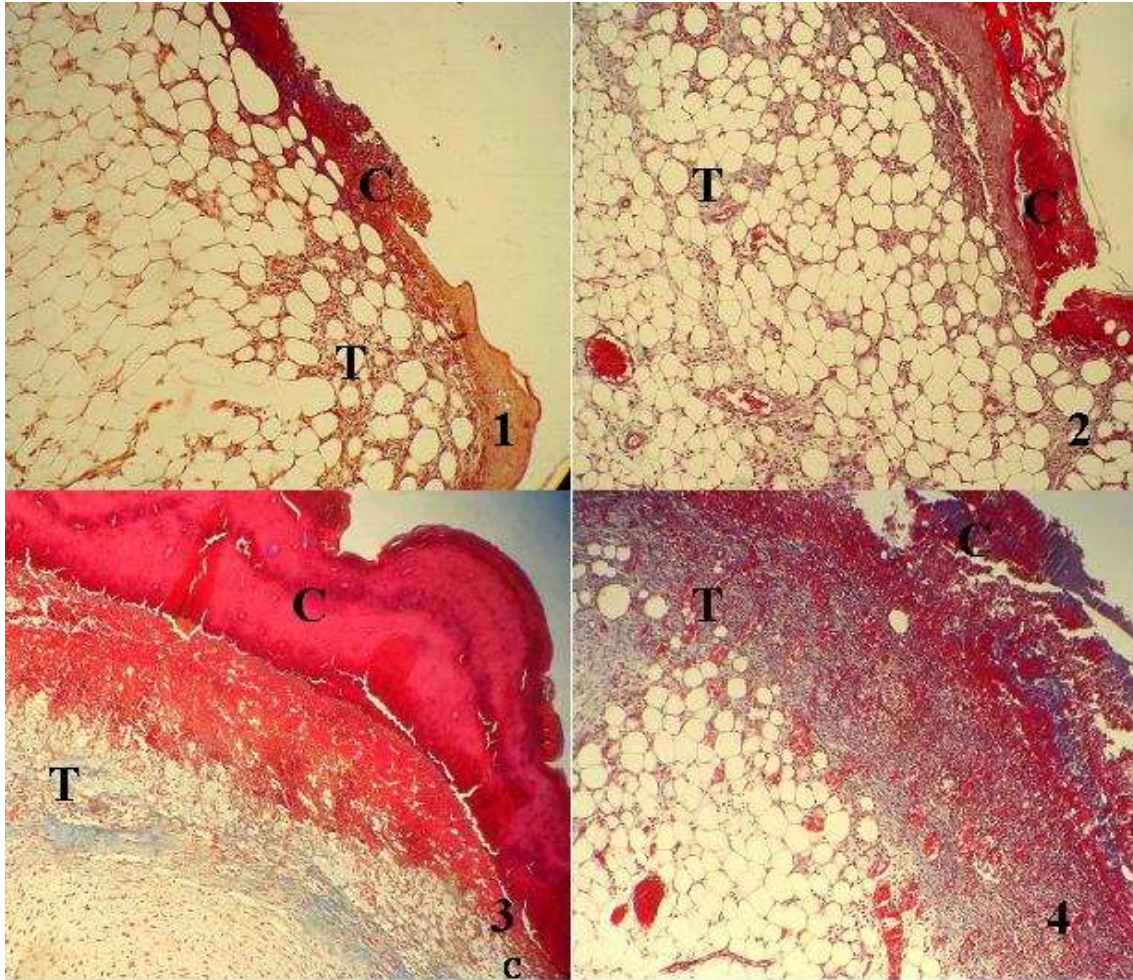


Figura 5. Aspectos histopatológicos das lesões cirúrgicas experimentais no 2º, 7º e 12º dias de pós-operatório. 1, grupo NaCl; 2, grupo manose; 3, grupo ConBr; 4, grupo ConBr/manose. C, crosta, T, tecido de granulação.

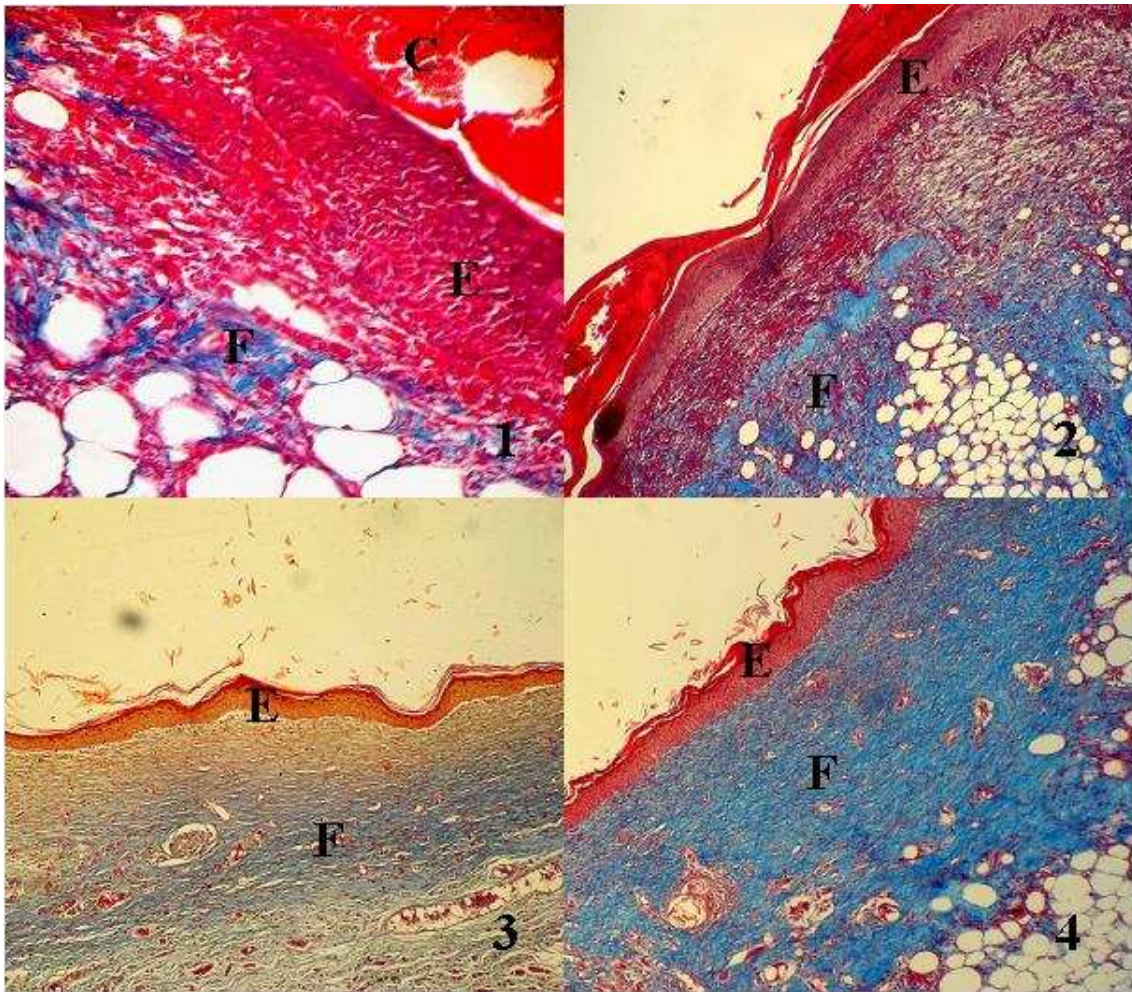


Figura 6. Aspectos histopatológicos das lesões cirúrgicas experimentais no 2º, 7º e 12º dias de pós-operatório. 1, grupo NaCl; 2, grupo manose; 3, grupo ConBr; 4, grupo ConBr/manose. C, crosta; E, epitélio; F, tecido de granulação fibrovascular,